

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA**



**BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE  
MINERALOCORTICOIDES Y ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA  
INCRETINA EN EL TRATAMIENTO DE LA MIOCARDIOPATÍA  
DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

**Tesis Doctoral**

**Elisa Ramírez Bustillo**

**Licenciada en Biología**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA**

**BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE MINERALOCORTICOIDES Y  
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INCRETINA EN EL TRATAMIENTO DE  
LA MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

**Tesis Doctoral**

**Elisa Ramírez Bustillo**

**Licenciada en Biología**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA**

**BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE MINERALOCORTICOIDES Y  
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INCRETINA EN EL TRATAMIENTO DE  
LA MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

**Tesis Doctoral**

**Elisa Ramírez Bustillo**

**Licenciada en Biología**

**Directores: Óscar Lorenzo González y José Tuñón Fernández**

**Servicio de Nefrología y Patología Vascular**

**Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz**

*En memoria de mi abuelo Héctor*

*“Para ir a donde no se sabe hay que ir  
por donde no se sabe”.*

*San Juan de la Cruz*





*Esta tesis es un gran sueño hecho realidad. Siempre me ha entusiasmado la investigación y el trabajo de laboratorio. Es un auténtico privilegio tener la oportunidad de aprender y descubrir cada día cosas nuevas y, en el fondo, comprender un poco mejor la vida. Quisiera agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis Jose Tuñón y Óscar Lorenzo la oportunidad de hacer este sueño realidad. Mil gracias a Rafael Bragado, eres la persona de quien más he aprendido en la Fundación, gracias por tu ayuda, por tus enseñanzas y disciplina y por tus “mini bronquitas” (siempre desde el cariño). Gracias al Dr. Egido por sus animosas palabras cada vez que ha visitado el laboratorio “pequeño”. Gracias también a Marta, Carmen, Jose Luis, Luis, Juan y Alberto Ortiz.*

*Gracias a la Fundación Conchita Rábago por becarme durante cuatro años para la realización de este trabajo y a Marta por su amabilidad. Gracias a Juaní, Pilar y Carlos por toda su ayuda en el animalario cuando tuve a mis ratitas. Juaní, has sido un gran apoyo en la Fundación, pero prefiero quedar contigo fuera para bailar salsa... Curra, gracias a ti también por tu ayuda y porque me encantaba pasarme horas en el confocal hablando de todo un poco y echándonos unas risas... Y Susana, he aprendido mucho contigo, gracias por dedicarme tu tiempo cada vez que has podido, muchas gracias.*

*Gracias a mis compañeros, en especial a Sandra, a la que quiero muchísimo y que siempre me ha aconsejado bien. Y gracias a su futuro esposo, Morguí. Habéis sido un apoyo fundamental para mí durante estos cuatro años. Olguí, mi niña, ¡qué puedo decir que no sepas ya!... ojalá hubieses llegado cuatro años antes al laboratorio... Y Caro, tienes razón, nunca olvidaré aquel congreso “desastre” de Valencia que nos unió tanto... Gracias a Kike por tantas y tantas charlas matutinas café en mano en las que hemos intentado arreglar el mundo... aunque no ha sido posible... Y gracias Jonay por tantas risas y cotilleos que hemos compartido, ¡tu sí que estás a la última en todo!. Gracias a Sebas y a Esther por tantas y tan buenas comidas juntos y a Rosario. Gracias a Adrián, a Cristian y a Sergio por los divertidos momentos en nuestro “labo”, especialmente a partir de las cinco de la tarde... Gracias a mis “chiquitines” de prácticas Lidia y Carlos, llegaréis lejos... Gracias también a Merché por los meses que pasamos juntas trabajando codo con codo en los que nos compenetramos a la perfección.*

*Un recuerdo para aquellos que se doctoraron y con los que coincidí estos años, como Avo, Julio, Beñat y Rox. En especial Raquel y Priscila con quienes he pasado muy buenos ratos. Nunca olvidaré las mañanas de sábado cuando grabamos vuestros vídeos de tesis, ¡lo bien que lo pasamos!. Gracias a Macarena, Matí, Patricia, Raúl, Valva, Tarín, Ana,*



*Cristina, Elena, Iolanda, Conchi, Olga y Ernesto. Gracias a Pilar e Isabel que han atendido siempre nuestras peticiones en el laboratorio. Gracias a los compañeros de Anatomía Patológica y de Bioquímica por ofrecerme siempre su ayuda. Mil gracias (y me quedó corta) a Chelo por su ayuda con el diseño de la tesis, ojalá hubiese encontrado más gente como tú durante este tiempo en la Fundación...*

*Gracias también a mis antiguos compañeros del 12 de Octubre, Marce, Chuchi, Mery, Pepe, Marga, Cristina, Pilar, Anita, Diana e Iván. ¡Vosotros sí que érais buenos compañeros!. ¡Guardo tantos buenos recuerdos de aquella etapa..!, creo que podría escribir un libro... y gracias a los que fueron mis jefes José María y Antonio. Con el tiempo y otra perspectiva se valoran más y mejor las cosas... Os tengo presentes y ojalá podáis leer estas líneas.*

*Gracias a mi familia, sobre todo a Juan por su paciencia infinita. Eres la mejor persona que he conocido en mi vida y mejor esposo aún. Eres “mi tesoooooro” y ¡¡te quiero muchísimo!!.* Gracias a mis padres, Héctor y Elisa por su constante apoyo en todos los aspectos. Sois los mejores padres que uno podría desear, así que, ¡qué suerte la mía!. Muchas gracias a Rosa María y José también por su ayuda y sus ánimos. Gracias a mi hermana Bea y a Chus por su apoyo técnico, ¡sois perfectos y adorables, casaos ya!. ¡Ah!, y gracias a mi Pupi. Gracias a Estibaliz y Amaya por ofrecerme su ayuda.

*Y, por último, gracias a mi pequeño que viene en camino, Daniel se es niño, Lorena sí niña, por el embarazo tan estupendo que estoy teniendo. Parece que ya te estoy viendo con tu carita redondita y tu nariz chata, ¡te como!. Eres mi inspiración y motivación. Te quiero.*

*Gracias a todos por hacer esto posible. ¡Muchas gracias!.*

*Elisa.*

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS</b>	5
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	11
1. Diabetes Mellitus	13
1.1. DM tipo-I (DM1)	14
1.2. DM tipo-II (DM2)	14
2. Miocardiopatía diabética	14
2.1. Alteraciones funcionales en MCD	15
2.2. Alteraciones estructurales en MCD	16
2.3. Alteraciones moleculares	19
2.4. Implicaciones del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) en la MCD	26
3. Diagnóstico de la MCD	27
3.1. Ecocardiografía	27
3.2. Resonancia magnética y tomografía computerizada	28
3.3. Tomografía de emisión de positrones (PET)	28
4. Terapéutica actual y potencial para MCD	28
4.1. Antagonistas del receptor de mineralocorticoides	29
4.2. Estimulantes del sistema incretina	30
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	33
1. Hipótesis	35
2. Objetivos	35
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
1. Modelos animales	39
1.1. Zucker Diabetic Fatty	39
1.2. Goto-Kakizaki	40
2. Estructura y función cardíaca	41
3. Micro-PET	42

4.	Cálculo de la homeostasis de la glucosa.....	43
5.	Caracterización de la hipertrofia, fibrosis, esteatosis, apoptosis y oxidación en tejido cardíaco .....	44
6.	Cultivos celulares .....	45
7.	Determinación de la asimilación de glucosa in vitro .....	46
8.	Determinación de la producción de ATP celular: .....	47
9.	Cuantificación de la apoptosis/supervivencia, acumulación lipídica y oxidación celular...	47
10.	Cuantificación de la acumulación lipídica tisular y celular .....	48
11.	Análisis de proteínas.....	48
11.1.	Western Blot y ELISA .....	49
12.	Determinación de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa .....	50
13.	Análisis estadístico: .....	51
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	53
1.	La administración de eplerenona redujo la hiperlipemia y la resistencia a insulina en ratas DM2/obesas.....	55
2.	La eplerenona atenuó la hipertrofia cardíaca y la disfunción diastólica en ratas ZDF .....	56
3.	La eplerenona redujo la fibrosis y apoptosis en el miocardio de ratas ZDF .....	57
4.	La eplerenona disminuyó la apoptosis en cardiomiocitos expuestos a una elevada dosis de ácido graso. ....	59
5.	La eplerenona redujo la esteatosis cardíaca en ratas ZDF.....	62
6.	La eplerenona disminuyó la asimilación y metabolismo lipídico en cardiomiocitos en cultivo. 65	
7.	La eplerenona revirtió la asimilación de glucosa en cardiomiocitos tratados con HF .....	67
8.	La eplerenona mejoró el estrés oxidativo sin afectar a proteínas reguladoras mitocondriales. 68	
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS II</b> .....	73
1.	La sitagliptina atenuó la hiperglicemia y resistencia a insulina en ratas GK.....	75
2.	La sitagliptina mejoró la asimilación de glucosa y la disfunción diastólica del miocardio GK.....	77
3.	La sitagliptina incrementó la expresión y translocación de Glut4 en detrimento de FAT/CD36 en el miocardio GK .....	78

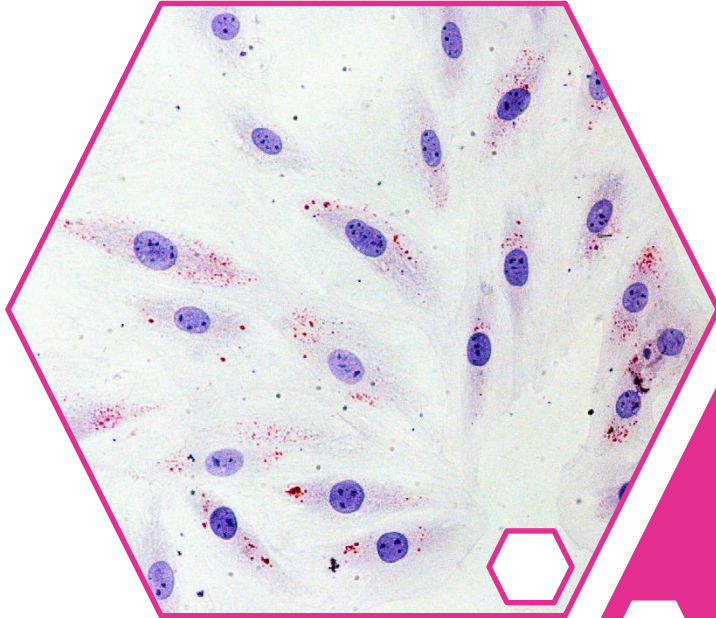
4. La sitagliptina redujo el metabolismo de FAs y mejoró la utilización de la glucosa en el miocardio GK.....	81
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>
<b>XI. ANEXO.....</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Incidencia mundial de DM.....	13
<b>Figura 2</b> - Desarrollo de la MCD como resultado de alteraciones moleculares, estructurales, y funcionales. .....	15
<b>Figura 3</b> - Vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. ....	17
<b>Figura 4</b> - Efectos derivados de la glucotoxicidad.....	20
<b>Figura 5</b> - Destinos de los FAs en la célula cardiaca. ....	22
<b>Figura 6</b> - Diferencias en la utilización de sustrato energético entre el corazón sano y DM2.....	24
<b>Figura 7</b> - Participación del sistema RAAS en el desarrollo de la MCD.....	26
<b>Figura 8</b> - Efectos cardiosaludables de la eplerenona. ....	29
<b>Figura 9</b> - Mecanismo de acción de GLP-1 y sitagliptina.....	30
<b>Figura 10</b> - Modelo experimental de obesidad y DM2.....	39
<b>Figura 11</b> - Modelo experimental de DM2. ....	41
<b>Figura 12</b> - Distribución en mapas polares del corazón para la cuantificación de [ <sup>18</sup> F]-FDG por PET .....	43
<b>Figura 13</b> - Líneas celulares de cardiomiocitos en cultivo.....	46
<b>Figura 14</b> - La eplerenona redujo la hiperlipemia en ratas obesas/DM2.....	55
<b>Figura 15</b> - La eplerenona podría mejorar la respuesta a insulina en ratas ZDF.....	56
<b>Figura 16</b> - La eplerenona mejoró la función y estructura cardiaca en ZDF.....	57
<b>Figura 17</b> - La eplerenona atenuó la hipertrofia y fibrosis celular en el miocardio de ratas ZDF.....	58
<b>Figura 18</b> - La eplerenona atenuó la apoptosis cardiaca en ratas ZDF. ....	59
<b>Figura 19</b> - HF indujo apoptosis en cardiomiocitos .....	60
<b>Figura 20</b> - La eplerenona redujo la apoptosis en cardiomiocitos expuestos a HF. ....	61
<b>Figura 21</b> - La eplerenona incrementó la viabilidad celular en cardiomiocitos expuestos a HF. ....	62
<b>Figura 22</b> - La eplerenona redujo la expresión y traslocación de FAT/CD36 en corazones ZDF.....	62
<b>Figura 23</b> - La eplerenona disminuyó la expresión de proteínas de movilización y oxidación de FAs en ratas ZDF.....	63
<b>Figura 24</b> - La eplerenona aminoró la esteatosis miocárdica y la reesterificación lipídica en ratas ZDF ...	64
<b>Figura 25</b> - La eplerenona disminuyó la formación de acúmulos lipídicos y la expresión de FAT/CD36 en cardiomiocitos estimulados con HF.....	65
<b>Figura 26</b> - La eplerenona atenuó la expresión de enzimas metabólicas y de reesterificación lipídica en cardiomiocitos estimulados con HF.....	66
<b>Figura 27</b> - La eplerenona redujo los niveles de esfingosina en cardiomiocitos estimulados con HF.....	67
<b>Figura 28</b> - La eplerenona mejoró la asimilación de glucosa en C2C12 estimuladas con HF.....	68
<b>Figura 29</b> - La eplerenona disminuyó los niveles de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mitocondriales en ratas ZDF.....	69
<b>Figura 30</b> - La eplerenona restauró la expresión de PPARα en el miocardio de ratas ZDF.....	70
<b>Figura 31</b> - Efecto anti-oxidante de la eplerenona en cardiomiocitos estimulados con HF. ....	71
<b>Figura 32</b> - La eplerenona restauró la producción de ATP sin afectar a proteínas reguladoras mitocondriales .....	72
<b>Figura 33</b> - La administración de sitagliptina redujo la hiperglicemia en ratas GK .....	75

<b>Figura 34</b> - La sitagliptina aminoró la resistencia a insulina y restauró los valores de GLP-1 plasmáticos en ratas GK.....	76
<b>Figura 35</b> - La sitagliptina aumentó la asimilación de glucosa en corazones GK.....	77
<b>Figura 36</b> - La sitagliptina aminoró la disfunción diastólica en ratas GK.....	78
<b>Figura 37</b> - La sitagliptina aumentó la translocación del receptor Glut4 al sarcolema en ratas GK sin afectar a Glut1 .....	79
<b>Figura 38</b> - La sitagliptina disminuyó la expresión y translocación de FAT/CD36 en corazones GK.....	80
<b>Figura 39</b> - La sitagliptina redujo la expresión de FABP3 y de proteínas de degradación de FAs en ratas GK .....	81
<b>Figura 40</b> - La sitagliptina no modificó la expresión de proteínas clave de resíntesis lipídica y biosíntesis de ceramidas y aminoró la expresión de PDK-4 en corazones GK.....	82
<b>Figura 41</b> - Efectos protectores de la eplerenona en el miocardio DM2/obeso. ....	89
<b>Figura 42</b> - Efecto de la sitagliptina sobre los transportadores de glucosa y FAs. ....	91





*RESUMEN*



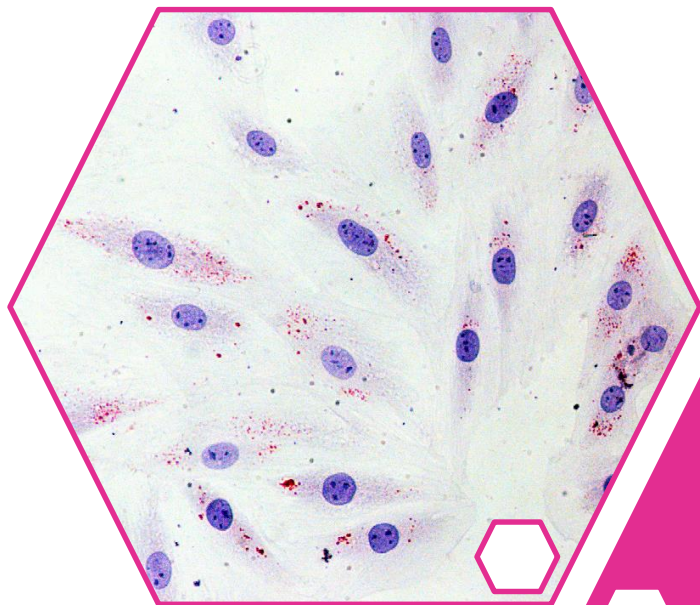


## RESUMEN

La esteatosis y apoptosis cardiaca son procesos clave en la miocardiopatía diabética, pero los mecanismos subyacentes causantes de estos eventos no son bien conocidos, lo que genera una carencia en su tratamiento. En este sentido, un fármaco bloqueante del receptor de mineralocorticoides, la eplerenona, ha demostrado propiedades anti-fibróticas en pacientes diabéticos y modelos experimentales. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre la esteatosis y apoptosis cardiaca. En un modelo crónico de ratas diabéticas tipo-II obesas observamos un aumento de los niveles de glucosa, aldosterona y lípidos circulantes. Además, había un incremento de fibrosis, apoptosis y esteatosis cardiaca en paralelo a disfunción diastólica y estimulación de transportadores de ácidos grasos (FAT/CD36 y FABP3), enzimas de la  $\beta$ -oxidación y proteínas pro-oxidantes/apoptóticas. El tratamiento con eplerenona atenuó la hiperlipemia y esteatosis, y redujo la expresión de FAT/CD36 y FABP3, y la formación de metabolitos lipotóxicos en ausencia de cambios en la glicemia. En cultivos de cardiomiocitos, el exceso de ácido graso saturado provocó un aumento en la acumulación de triglicéridos y ceramidas así como un incremento en la producción de factores pro-oxidantes/apoptóticos. Estos eventos también fueron mitigados por eplerenona. El tratamiento con eplerenona podría, por tanto, mejorar la función cardiaca en diabetes tipo-II y obesidad a través de la reducción de los procesos de esteatosis, apoptosis y oxidación cardiaca. Incluso en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, nuestro trabajo aboga por el control de la lipotoxicidad cardiaca para paliar el desarrollo de miocardiopatía diabética. Por otro lado, en un modelo crónico de ratas diabéticas tipo-II, la administración de sitagliptina, un fármaco antidiabético inhibidor de la enzima DPP-4, incrementó los niveles de incretina GLP-1 y redujo la hiperglicemia y resistencia a insulina, sin afectar al perfil lipídico. Además, la sitagliptina estimuló la translocación al sarcolema del transportador de glucosa Glut4 en detrimento de FAT/CD36. Por tanto, el tratamiento con sitagliptina podría mejorar la función cardiaca en diabetes tipo-II mediante el aumento de la sensibilidad a insulina y por regulación directa de la asimilación de glucosa y ácidos grasos en el cardiomiocito, y reducción de la lipotoxicidad.

## SUMMARY

Cardiac steatosis and apoptosis are key processes in diabetic cardiomyopathy, but the underlying mechanisms are not well known, leading to a lack of treatment. In this regard, a blocking agent for mineralocorticoid receptors, eplerenone, has demonstrated anti-fibrotic properties in diabetic patients and experimental models. However, its effect on cardiac steatosis and apoptosis is unknown. In a chronic model of type-II diabetic/obese rats we observed high levels of plasma glucose, lipids and aldosterone. In the heart, there was an increase of fibrosis, steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction, and also, an stimulation of fatty acid transporters (FAT/CD36 and FABP3),  $\beta$ -oxidation enzymes and pro-oxidant/apoptotic molecules. Interestingly, eplerenone administration attenuated hyperlipidemia and steatosis, and reduced the expression of FAT/CD36 and FABP3, and the formation of lipotoxic metabolites in the absence of changes in glycemia. In cultured cardiomyocytes, an excess of saturated fatty acid caused an increase in the accumulation of triglycerides and ceramides and overproduction of pro-oxidant/apoptotic factors. These events were also mitigated by eplerenone. Thus, eplerenone could improve cardiac function in type-II diabetes and obesity by reducing steatosis processes, oxidation and apoptosis. Even in the presence of high concentrations of glucose, our work advocates the control of cardiac lipotoxicity to reduce the development of diabetic cardiomyopathy. Furthermore, in a chronic model of type-II diabetic rats, sitagliptin, an antidiabetic drug inhibiting DPP-4 enzyme, increased levels of incretin GLP-1 and reduced hyperglycemia and insulin resistance without affecting the lipid profile. Sitagliptin stimulated translocation to sarcolemma of glucose transporter Glut4 in detriment of FAT/CD36. Therefore, sitagliptin could improve cardiac function in type-II diabetes by increasing insulin sensitivity and by direct regulation of glucose and fatty acids uptake in the cardiomyocyte, and following lipotoxicity.



*ABREVIATURAS*



*Abreviaturas*

- 2-NBDG 2-(*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

*A*

- ACADI Acyl-CoA dehydrogenase, long chain
- ACADm Acyl-CoA dehydrogenase, medium chain
- Acil-coA Acil coenzima A
- ACS Acyl-CoA Synthase
- ACSL Acyl-CoA Synthase, long chain
- AGEs Advanced Glycation End products
- AKT Protein kinase B
- AMPc Cyclic adenosine monophosphate
- AMPK AMP-activated protein Kinase
- Ang-II Angiotensin-II
- ANP Atrial natriuretic peptide
- AP-1 Activator protein-1
- Apaf-1 Apoptosis protease-activating factor-1
- ATP Adenosine triphosphate

*B*

- BNP Brain natriuretic peptide

*C*

- Ch Cholesterol
- CPT-1 Carnitine palmitoyltransferase-1
- CT-1 Cardiotrophin-1
- CTGF Connective tissue growth factor

*D*

- DAG Diacylglycerol
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DGAT-1 Diglyceride acyltransferase-1
- DM Diabetes mellitus
- DPP-4 Dipeptidyl peptidase-4

*E*

- EEA-1 Early endosome antigen-1
- EF Ejection fraction
- EGF Epidermal growth factor
- eNOS Endothelial nitric oxide synthase
- ERK 1/2 Extracellular-signal-regulated kinases

- ET-1 Endothelin-1

## F

- FA Fatty Acids (Ácidos grasos)
- FABP3 Fatty acid-binding protein-3
- FABPpm Plasma membrane fatty acid-binding protein
- FADD Fas-Associated protein with Death Domain
- FasL Fas ligand
- FAT/CD36 Fatty acid translocase/ Cluster of Differentiation 36
- FATP Fatty acid transport protein
- FN-1 Fibronectin-1

## G

- GIP Gastric inhibitory polypeptide
- GK Goto-Kakizaki
- GLP-1 Glucagon like peptide-1
- GLP-1R GLP-1 Receptor
- Glut Glucose transporters
- GPAT-1 Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase-1
- GPox Glutathione peroxidase

## H

- HbA<sub>1c</sub> Hemoglobina glicosilada
- HO-1 Heme oxygenase-1
- HOCl Hypochlorous acid

## I

- ICAM Intercellular adhesion molecule
- IGF-1 Insulin-like growth factor-1
- IKK I  $\kappa$  B kinase
- IL-1 $\beta$  Interleukin-1 $\beta$
- IL-6 Interleukin-6
- IRS-1 Insulin receptor substrate-1
- IVS Interventricular septum

## J

- JNK Jun kinase

## L

- LVDD Left ventricular diastolic diameter
- LVPW Left ventricular posterior wall
- LVSD Left ventricular systolic diameter

## M

- MAPK Mitogen-activated protein kinase

- MCD Miocardiopatía diabética
- MCP-1 Monocyte chemoattractant protein-1
- MEC Matriz extracelular
- MEF-2 Myocyte enhancer factor-2
- MMPs Matrix metalloproteinases
- mPTP Mitochondrial permeability transition pore
- MR Mineralocorticoid receptor (Receptor de mineralocorticoides)

## N

- NEFA Non-esterified fatty acids
- NFAT Nuclear factor of activated T-cells
- NF-κB Nuclear factor-κB
- NO Nitric oxide
- NOS Nitric oxide synthase
- NOX NADPH oxidase
- NRF1 Nuclear respiratory factor-1

## O

- O<sub>2</sub><sup>-</sup> Anión superóxido
- OGTT Oral glucose tolerance test

## P

- PAI-1 Plasminogen activator inhibitor-1
- PFA Paraformaldehído
- PDH Pyruvate dehydrogenase
- PDK4 Pyruvate dehydrogenase kinase-4
- PET Positron Emission Tomography
- PGC-1α Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α
- PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase
- PKC Protein kinase C
- PLIN5 Perilipin5
- PPAR Peroxisome proliferator-activated receptors
- PPRE Peroxisome proliferator response elements

## R

- RAAS Renin-angiotensin-aldosterone system
- RAGE Receptor for Advanced Glycation End products
- ROS Reactive oxygen species

## S

- SGLT Sodium-dependent glucose cotransporters
- SOD Superoxide dismutase
- Sp-1 Specificity protein-1



- SPECT Single-photon emission computed tomography
- SPTLC2 Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2
- STAT Signal transducers and activators of transcription

## T

- TAG Triacylglycerol
- TCA Tricarboxylic acid
- TGF- $\beta$  Transforming growth factor- $\beta$
- Tfam Mitochondrial transcription factor A
- TIMP Tissue inhibitors of metalloproteinases
- TNF- $\alpha$  Tumor necrosis factor- $\alpha$
- TRADD Tumor necrosis factor receptor associated DEATH domain protein

## U

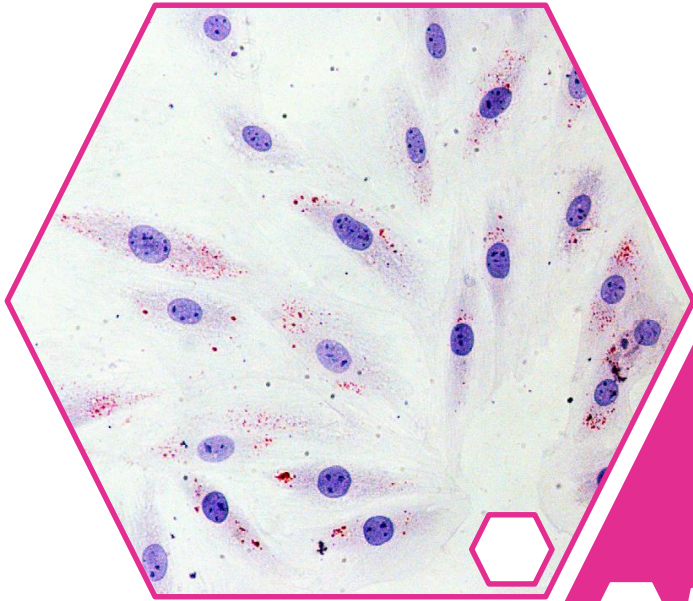
- UFPR Unfolded factor protein response
- UHPLC Ultra high pressure liquid chromatography

## V

- VCAM-1 Vascular cell adhesion molecule-1
- VEGF Vascular endothelial growth factor
- VI Ventrículo izquierdo

## Z

- ZDF Zucker diabetic fatty

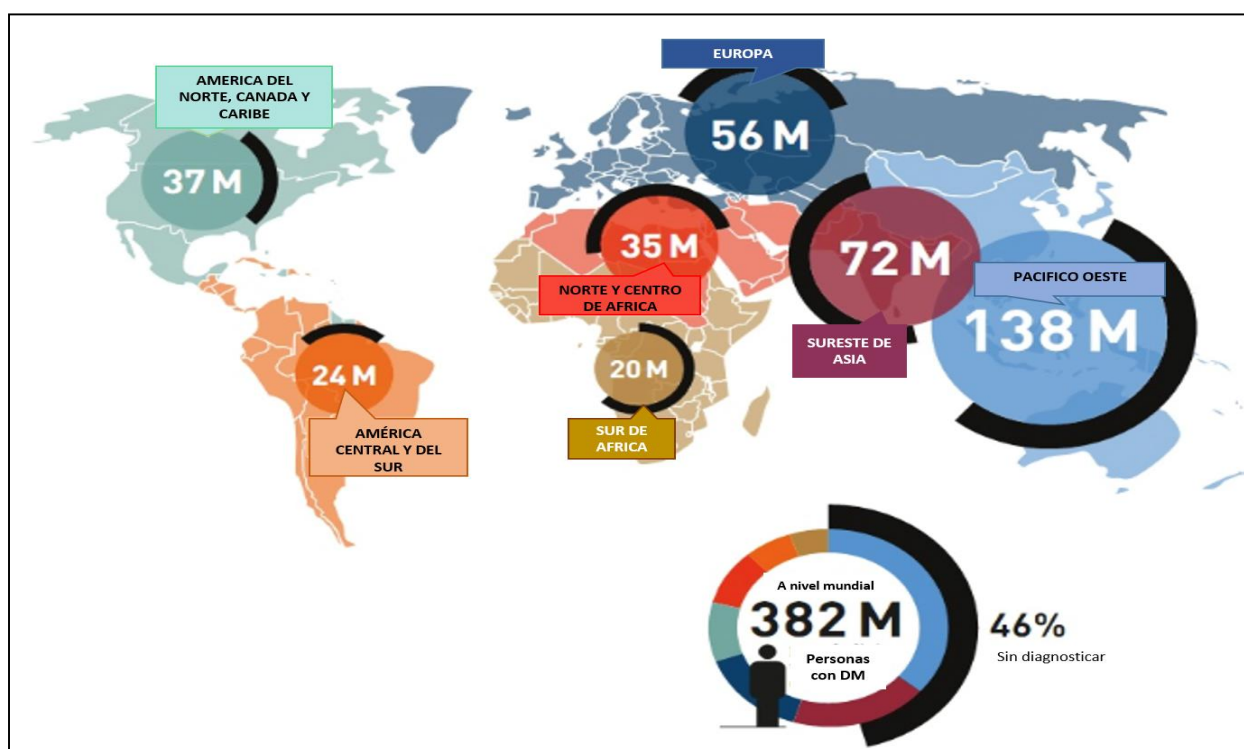


## *INTRODUCCIÓN*



## 1. Diabetes Mellitus

La *Diabetes Mellitus* (DM) es una enfermedad endocrino-metabólica crónica y multifactorial debida inicialmente a una alteración en la homeostasis de la glucosa que aparece cuando las células- $\beta$  del páncreas no producen insulina suficiente o cuando ésta no se utiliza eficazmente [2]. DM es la quinta causa de mortalidad a nivel mundial. Actualmente se estima que hay más de 382 millones de personas que padecen DM, lo que equivale a un 8% de la población mundial, pero esta cifra podría ser mucho mayor debido a que millones de personas padecen la enfermedad pero no están diagnosticadas (figura 1). De éstos pacientes, el 80% vive en países en vías de desarrollo o subdesarrollados.



**Figura 1 - Incidencia mundial de DM.** Por regiones, millones de sujetos con DM en 2013 (la semicircunferencia negra representa los casos sin diagnosticar). Esquema adaptado de la IDF (Federación Internacional de Diabetes), 2013.

Lamentablemente, en 2035 el número de pacientes con DM podría alcanzar los 592 millones [3]. El cambio de hábitos de vida y la obesidad frecuentemente asociada, favorecen el aumento de esta patología. En España existen más de 3 millones de casos diagnosticados, lo que supone un 10,8% de la población adulta. De seguir la tendencia actual, en 2035 este porcentaje podría alcanzar el 15%. La DM supone, además, unos costes socio-económicos a nivel mundial de 548.000 millones de dólares que, en 2035 se estima pudieran alcanzar los 627.000 millones. Se han descrito dos variantes principales de DM: DM tipo-I y tipo-II.

### 1.1. DM tipo-I (DM1)

También llamada juvenil o insulino-dependiente. Se caracteriza por una producción deficiente de insulina debido generalmente a una respuesta autoinmune que provoca la destrucción de las células- $\beta$  pancreáticas, lo que induce una carencia en la asimilación de glucosa por los tejidos y un exceso de glucosa circulante (hiperglicemia) [4]. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos pacientes, si no reciben el tratamiento adecuado podrían desarrollar DM tipo-II dependiendo de factores genéticos y ambientales. El principal parámetro que refleja el índice hiperglicémico es la hemoglobina glicosilada ( $HbA_{1c}$ ) que en el paciente DM1 supera el 7%. Cada punto de  $HbA_{1c}$  equivale a un aumento de 28-29 mg/dl de glucosa en sangre y se correlaciona con aproximadamente un 11% de aumento de mortalidad de origen cardiovascular [5].

### 1.2. DM tipo-II (DM2)

También llamada diabetes de inicio en la edad adulta o insulino-independiente, se desarrolla a causa de un uso ineficaz de la insulina. La DM2 se caracteriza por presentar hiperglicemia, e hiperinsulinemia en estados iniciales debido a un mecanismo compensador del páncreas que evoluciona hacia un estado de resistencia a insulina en los tejidos periféricos y posterior deficiencia en la producción de ésta, e hiperlipidemia. La resistencia a insulina es el principal rasgo de la DM2 y podría preceder a su diagnóstico por 10-20 años [6]. La DM2, que representa el 90% de los casos de DM, podría incrementarse debido a comorbilidades como la obesidad y dislipemia [7]. De hecho, el riesgo de padecer DM aumenta de forma progresiva conforme lo hace el índice de masa corporal. En este sentido, alrededor de un 80% de pacientes DM2 presentan sobrepeso u obesidad [8]. Los síntomas pueden ser similares a los de la DM1 pero, a menudo, menos intensos. En consecuencia, la enfermedad suele ser asintomática y diagnosticarse con varios años de evolución (entre 15 y 20), tras la aparición de complicaciones cardiovasculares.

La relación entre la DM y el fallo cardíaco es bidireccional. No sólo los pacientes con DM tienen un mayor riesgo de padecer fallo cardíaco sino que también un paciente con fallo cardíaco tiene una alta probabilidad de desarrollar DM, debido a la mayor propensión a sufrir resistencia a insulina, una condición asociada con el aumento del riesgo de padecer DM2 y enfermedad cardiovascular [9]. Estudios epidemiológicos han demostrado que las complicaciones cardiovasculares son más comunes (2-4 veces) entre los pacientes DM2 que en la población no diabética, propiciando un peor pronóstico del paciente DM2 y siendo responsable del 80% de la mortalidad [10].

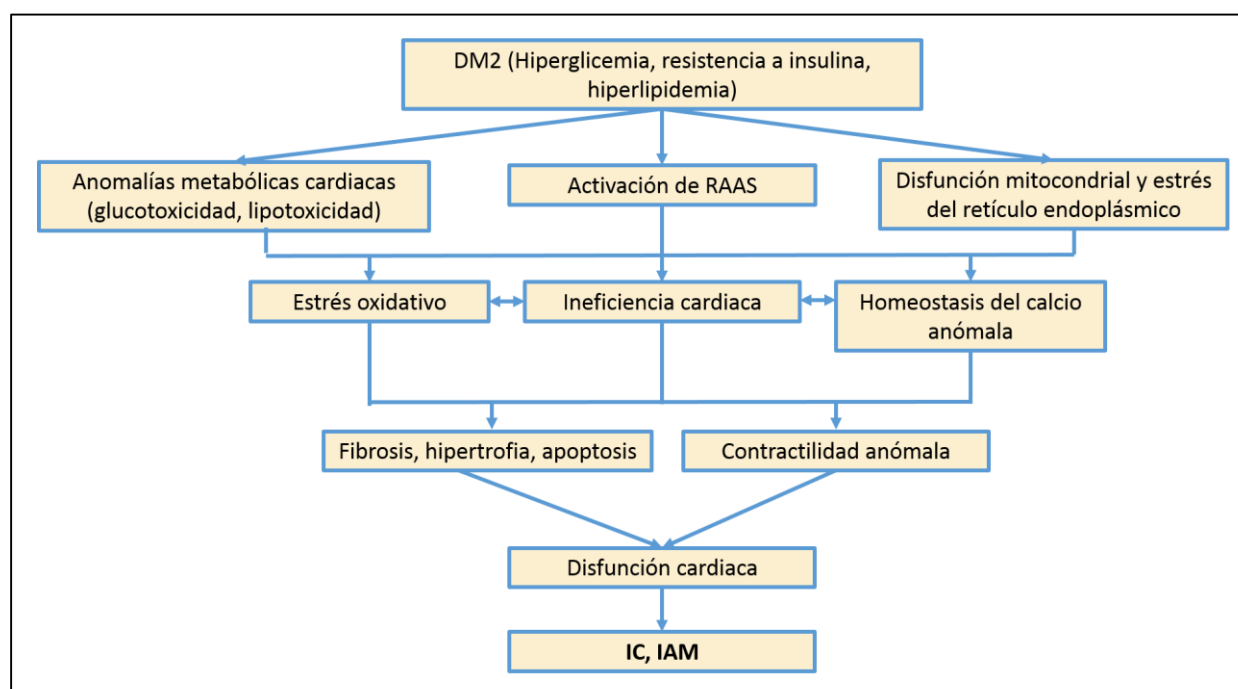
## 2. Miocardiopatía diabética

Nuestro grupo de trabajo se ha especializado en el efecto directo de la DM sobre el corazón. A pesar de la existencia de complicaciones micro- (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (enfermedad arterial coronaria e ictus), la DM puede afectar directamente a tejidos periféricos como el miocardio [11]. En 1972 se describieron cuatro pacientes con DM y fallo cardíaco sin hipertensión o enfermedad coronaria [12]. La disección anatómica de sus corazones reveló hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI) y fibrosis, sin evidencia de ateroma coronario o cualquier otra patología cardíaca. Esta entidad clínica se consideró independiente y recibió el nombre de miocardiopatía diabética (MCD). Alrededor de la

mitad de pacientes DM sin patología vascular pueden sufrir enfermedad cardíaca [13]. La patogénesis de la MCD es multifactorial y se caracteriza por cambios funcionales, estructurales y metabólicos en el corazón que pueden concurrir de forma sinérgica (figura 2).

### 2.1. Alteraciones funcionales en MCD

La MCD se caracteriza en etapas tempranas por disfunción diastólica e hipertrofia ventricular y en etapas más avanzadas por disfunción sistólica que progresa hacia fallo cardíaco y/o infarto agudo de miocardio (figura 2) [14]. La prevalencia de fallo cardíaco con función sistólica preservada en pacientes con DM oscila entre el 19% y el 26%, por lo que la MCD puede ser asintomática durante mucho tiempo [15]. Posteriormente, los pacientes muestran disfunción tanto diastólica como sistólica acompañada de una reducción de la fracción de eyección (EF) y dilatación del VI.



**Figura 2 - Desarrollo de la MCD como resultado de alteraciones moleculares, estructurales, y funcionales.** Las alteraciones metabólicas producidas en el seno de la DM2 provocan cambios en la estructura y funcionalidad de los cardiomiocitos ya en los primeros días, anomalías en la función contráctil en las primeras semanas, y cambios morfológicos y funcionales en los meses posteriores al debut de la enfermedad [16]. IC: Insuficiencia cardíaca; IAM: infarto agudo de miocardio.

#### 2.1.1. Disfunción diastólica

La fase diastólica de la función cardíaca incluye dos procesos: la relajación del VI, que tiene lugar durante la relajación isovolumétrica (periodo entre el cierre de la válvula aórtica y la apertura de la válvula mitral) y la fase de llenado del VI, un proceso pasivo que depende de la distensibilidad del miocardio. La disfunción diastólica sobreviene cuando el VI es incapaz de relajarse, lo que lleva al desarrollo de hipertrofia. La función diastólica se puede evaluar estudiando el flujo transmitral, la relación entre las velocidades de llenado temprana (E) y tardía (A) del VI (ratio E/A, <1 en disfunción diastólica), tiempo de deceleración y tiempo de relajación isovolumétrica [17]. Además, en pacientes DM2 con MCD existe una asociación significativa entre la disfunción diastólica del VI y la presencia de arritmias ventriculares [18].

### 2.1.2. *Disfunción sistólica:*

La disfunción sistólica consiste en una alteración de la capacidad de contracción del VI para bombear sangre. Debido al vaciado incompleto del VI y la presión diastólica, los volúmenes del VI aumentan y desencadenan hipertrofia del VI. Las principales características de la disfunción sistólica son el descenso de la contractilidad que se manifiesta por una reducción de la EF superior o igual al 40%, así como de la fracción de acortamiento (FA), que refleja el cambio de las dimensiones del VI en cada contracción, aumento del índice de masa y del diámetro del VI en diástole, e incremento del grosor y rigidez de las paredes del VI [19].

### 2.2. *Alteraciones estructurales en MCD*

Los cambios anatómicos observados en la MCD son, fundamentalmente, hipertrofia celular y fibrosis e inflamación miocárdica. Además, se han descrito apoptosis y esteatosis celular (figura 2) [13]. El daño celular podría promover la muerte en las células cardíacas, la salida de componentes celulares y la respuesta pro-inflamatoria. Posiblemente, las células supervivientes reaccionan aumentando su tamaño celular, y produciendo fibrosis intersticial. Además, el exceso de lípidos circulantes podría producir su acumulación en el interior celular (esteatosis) comprometiendo así su viabilidad.

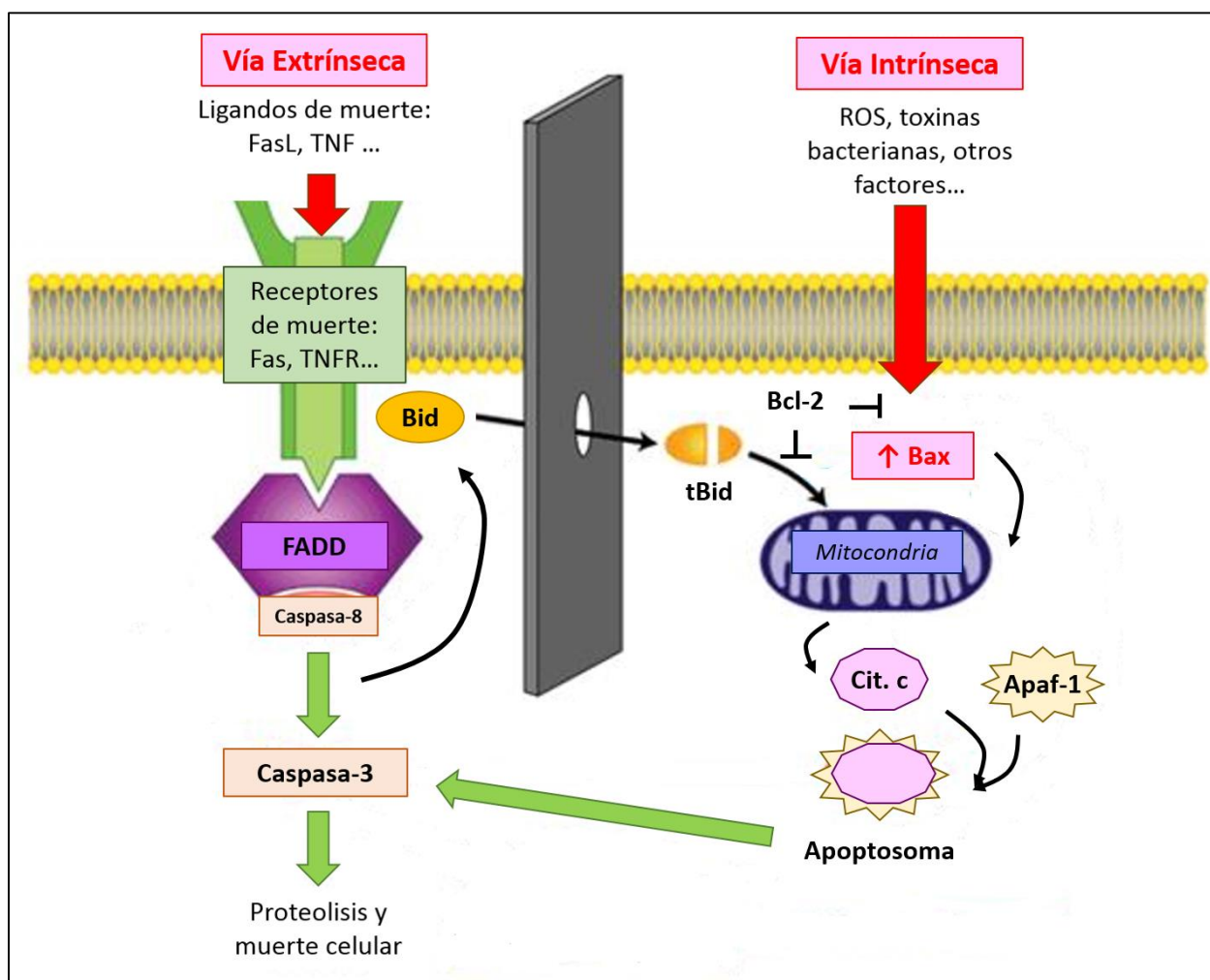
#### 2.2.1. *Muerte celular*

La MCD se caracteriza por una muerte acelerada del cardiomiocito, principalmente por apoptosis [20]. La apoptosis o muerte celular “programada” es un proceso dependiente de energía en el que la cromatina se condensa en el núcleo, se paraliza la transcripción del mRNA y la síntesis de proteínas, y se produce la fragmentación celular. Este proceso se manifiesta por la aparición de vesículas esféricas citosólicas (cuerpos apoptóticos) que son fagocitadas por macrófagos sin provocar normalmente reacción inflamatoria acompañante. El mecanismo interno de la apoptosis puede desencadenarse por estímulos de origen extracelular o intracelular. Moléculas de la familia del TNF- $\alpha$  o el ligando de Fas (FasL), activan la vía extrínseca apoptótica mediante su unión a receptores específicos de membrana TNFR1 y Fas, respectivamente. Estos receptores están asociados a un “dominio de muerte” intracelular que recluta y activa caspasa-8 a través de adaptadores específicos como TRADD o FADD, respectivamente. Una vez activa, la caspasa-8 estimula la caspasa-3 que es una caspasa ejecutora de apoptosis, actuando sobre proteínas estructurales y enzimáticas, y sobre el DNA nuclear, originando su destrucción (figura 3) [21]. Además, la activación de caspasa-8 puede activar la proteína pro-apoptótica Bid, miembro de la familia de proteínas Bcl-2, capaz de translocarse a la mitocondria para ampliar la respuesta apoptótica inducida por la vía intrínseca [22]. En este caso, estímulos celulares endógenos, como el desequilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas (ej: Bax) frente a las anti-apoptóticas (ej: Bcl-2), inducen apoptosis. Bax perturba la integridad de la membrana mitocondrial permitiendo la salida de citocromo-c al citosol, donde se une al factor Apaf-1 formando el apoptosoma. Éste a su vez se une a caspasa-9 desencadenando una cascada de reacciones de proteólisis que conducen a la activación de caspasa-3 (figura 3) [23].

Además, el corazón diabético puede sufrir también muerte por necrosis celular [24]. En este caso se desencadena en respuesta a estímulos como altos niveles plasmáticos de FAs, depleción de la síntesis de



ATP y exceso del consumo de  $O_2$ , que conducen a un deterioro de la contractilidad y periodos transitorios de isquemia que provocan la ruptura temprana de la membrana plasmática y turgencia de orgánulos como la mitocondria [25]. La necrosis es un proceso irreversible del destino celular, con desnaturalización de proteínas por acción de los lisosomas (autólisis) o de enzimas líticas de células leucocitarias adyacentes (heterólisis). Además existe una degradación de material genético que conduce a la desintegración celular y salida de componentes celulares que, en este caso, pueden desencadenar una respuesta inflamatoria [26].



**Figura 3 – Vías apoptóticas extrínseca e intrínseca.** La unión de ligandos específicos como FasL a sus receptores de muerte (Fas) inicia la vía extrínseca de la apoptosis, mientras que la activación de proteínas mitocondriales como Bax provoca la aparición de poros en la membrana externa mitocondrial que permite la salida de citocromo-c, dando lugar al inicio de la vía intrínseca. Ambas vías pueden converger en la activación de caspasa-3 por medio de la hidrólisis y translocación de Bid.

Los procesos acelerados de apoptosis y necrosis pueden ser consecuencia en la MCD por la hiperglicemia, estrés oxidativo, acumulación de productos secundarios de glucosa y lípidos, disfunción mitocondrial y sobreactivación del sistema RAAS [25]. También se ha sugerido que la apoptosis del cardiomiocito está mediada por la producción de proteínas proinflamatorias como MCP-1, proporcionando un vínculo entre inflamación y MCD [27]. En trabajos previos en DM experimental de nuestro grupo



observamos un aumento de expresión cardíaca del receptor Fas y de proteínas pro-apoptóticas como Bax y ANXA5 entre otras [28, 29]. Asimismo, en un modelo de ratas DM2 observamos aumento de núcleos apoptóticos y expresión de caspasa-3 en el miocardio [30].

### 2.2.2. *Inflamación*

La respuesta inflamatoria presenta tres etapas bien diferenciadas: cambios en el flujo vascular, aumento de la permeabilidad (con extravasación leucocitaria) y fagocitosis [31]. MCD y obesidad se caracterizan por un bajo grado de inflamación cardíaca crónica. Los estados hipóxico, pro-oxidante y necrótico en MCD se caracterizan por una elevada producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6, que activan NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que induce la expresión de proteínas pro-inflamatorias, promoviendo el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T, así como la infiltración de leucocitos [32]. En el corazón de pacientes MCD se ha encontrado sobreexpresión de genes inflamatorios como proteína C reactiva, MCP-1, PAI-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, y moléculas de adhesión como ICAM-1 o VCAM-1 [33]. En el corazón diabético, tanto las células infiltrantes como los cardiomiocitos son capaces de producir estas citoquinas [34]. Una elevación en los niveles de FAs plasmáticos provoca también la activación de NF- $\kappa$ B [35]. Nosotros demostramos previamente un aumento de proteínas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 y VCAM-1 y activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en estadios iniciales pero no crónicos de MCD experimental [28]. En este mismo trabajo, en cultivos de cardiomiocitos demostramos que el exceso continuo de glucosa indujo la expresión de moléculas anti-inflamatorias como HO-1 y TGF- $\beta$ .

### 2.2.3. *Hipertrofia celular*

El tipo celular principal implicado en procesos hipertróficos en el corazón es el cardiomiocito. Éstos representan aproximadamente el 30% del número total de células, sin embargo, dado su gran tamaño constituyen alrededor del 80% del volumen del corazón [36]. La hipertrofia del VI en MCD surge como resultado de un conjunto de estímulos como la activación neurohumoral y liberación autocrina y paracrina de factores de crecimiento y citoquinas [37]. Cada uno de estos estímulos desencadena a su vez activación de receptores de membrana que promueven vías de señalización pro-hipertróficas y que culminan en una excesiva síntesis de proteínas sarcoméricas cuya agrupación en paralelo provoca el crecimiento en grosor del cardiomiocito y, en conjunto, el crecimiento concéntrico del VI [38]. Entre los receptores de membrana involucrados se encuentran los acoplados a proteína G, los receptores con actividad tirosina quinasa, los de citoquinas e integrinas. Las vías de señalización activadas pueden ser MAPK, NFAT, AP-1, MEF-2, IGF-1, EGF, STAT y CT-1 [37, 39-41]. Por otro lado, los péptidos natriuréticos ANP y BNP son hormonas de origen cardíaco con efecto diurético, natriurético y vasodilatador que se liberan desde el miocardio a modo de respuesta como agentes anti-hipertróficos interfiriendo, entre otras, con la vía calcineurina-NFAT [42]. Modelos de DM1 y DM2 experimental previos de nuestro grupo exhibieron hipertrofia del VI, del cardiomiocito y aumento de expresión de los factores pro-hipertróficos ANXA-5 y ANP [28, 30].

### 2.2.4. *Fibrosis cardíaca*

La fibrosis resulta de una descompensación entre la producción de matriz extracelular (MEC) y su degradación. En MCD, la fibrosis predominante es la fibrosis de reemplazo, causada por la sustitución del cardiomiocito perdido por proteínas de MEC. La fibrosis intersticial y perivascular se deben a un aumento

de la acumulación de proteínas de MEC en el intersticio y alrededor de los vasos, respectivamente [20]. La fibrosis intersticial es una característica histológica temprana de la MCD y contribuye a la reducción de la función cardíaca [12]. Las proteínas principales que componen la MEC son colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas (como FN-1), y sus principales productores son los fibroblastos y, en menor medida, los cardiomiocitos. Entre los colágenos, los tipos I, III y IV son los más abundantes. Los estímulos principales que inducen la expresión de estas proteínas son la hiperglicemia y la resistencia a insulina [43]. La expresión de colágenos y FN-1 está regulada a su vez por factores pro-fibróticos como TGF- $\beta$  o CTGF. A través de la unión a su receptor, TGF- $\beta$  fosforila proteínas Smads (Smad 2/3) y activa factores de transcripción como Smad4 y AP-1 que aumentan la síntesis de MEC [44]. En biopsias de pacientes MCD se ha observado fibrosis intersticial y perivascular con aumento significativo de la deposición de colágenos y de la expresión de TGF- $\beta$  [45]. Resultados similares obtuvimos en modelos previos de DM1 [28] y DM2 [30]. Las ratas diabéticas presentaron fibrosis cardíaca intersticial y perivascular, abundantes depósitos de colágeno (sobre todo tipo-I) y FN-1, y aumento de la expresión de TGF- $\beta$  y CTGF.

#### 2.2.5. *Esteatosis cardíaca*

La acumulación de lípidos en tejidos no destinados a ello (tejido no adiposo), como el corazón, es uno de los principales eventos en la MCD, especialmente en pacientes DM2 con obesidad. Los lípidos circulantes se asimilan y depositan en pequeños orgánulos esféricos (0,2-10  $\mu$ m de diámetro) en el citosol de células cardíacas. Estos orgánulos se conocen como “*lipid droplets*” (LD) o gotas lipídicas. Están compuestos por TAGs y ésteres de colesterol rodeados de una monocapa de fosfolípidos y diversas proteínas, entre las que destaca perilipina-5 (PLIN5) por su implicación en el metabolismo lipídico [46]. La función principal de los LD es el almacenamiento de sustrato energético lipídico que suministra el recambio de TAGs en la célula. Sin embargo, un exceso de LD puede dar lugar a complicaciones en la oxidación de estos sustratos y sobreproducción de ROS y metabolitos secundarios tóxicos como esfingosinas y ceramidas [47]. La lipotoxicidad asociada al desarrollo de MCD es causa principal de la muerte celular. En pacientes con MCD y obesidad, la grasa además se acumula alrededor del corazón como tejido adiposo epicárdico y extra-pericárdico, y es capaz de liberar factores pro-inflamatorios [48].

### 2.3. *Alteraciones moleculares*

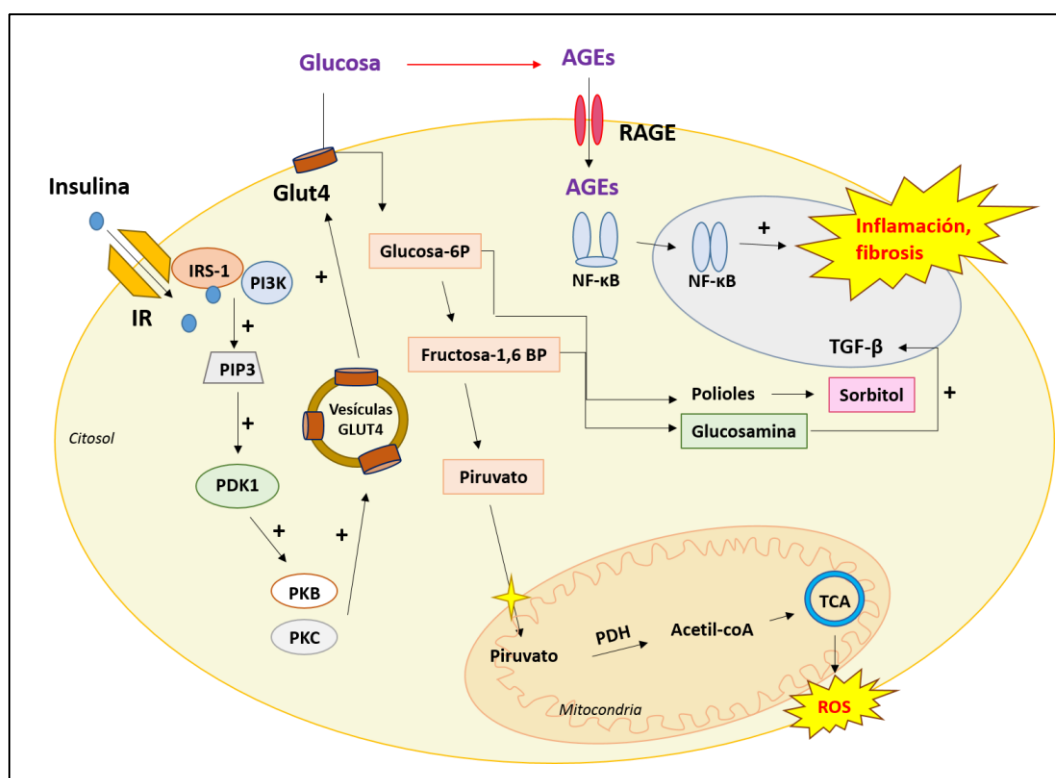
No se conocen bien los mecanismos intracelulares subyacentes que originan los cambios estructurales y funcionales en el corazón diabético. Sin embargo, se han implicado diferentes vías y moléculas alteradas.

#### 2.3.1. *Alteraciones metabólicas*

Las principales alteraciones metabólicas en MCD comprenden hiperglicemia, que producirá glucotoxicidad, hiperlipemia que derivará en lipotoxicidad, y modificación en la utilización de sustratos energéticos (figura 2).

### 2.3.1.1. Glucotoxicidad

En pacientes y modelos experimentales de DM2, la resistencia a insulina induce un descenso en la asimilación de glucosa periférica, e hiperglicemia. La glucosa viaja solubilizada en sangre y se asimila en el corazón a través de las membranas celulares mediante mecanismos dependientes de sodio, por difusión facilitada o por transportadores proteicos [49]. Los transportadores de glucosa (Glut) están disponibles en 12 isoformas diferentes. Glut4 y Glut1 son los principales transportadores de glucosa en el miocardio. Glut1 está localizado de forma permanente en la membrana y se cree que es el mediador primario de la entrada de glucosa [50]. Para el transportador Glut4, la insulina regula su translocación al sarcolemma desde el pool de vesículas intracelulares. La insulina actúa a través de su unión al receptor de insulina que lleva a la activación de IRS-1. Éste recluta y activa PI3K que forma PIP3 que a su vez transactiva PDK1, la cual fosforila a PKB y PKC. Estos interactúan con receptores endosomales para inducir la translocación de Glut4 (figura 4) [51]. Este proceso puede también ser inducido como respuesta a una gran variedad de estímulos como hipoxia, isquemia o sobrecarga de trabajo cardíaco, con el fin de aumentar la entrada de glucosa y el metabolismo glicolítico. Sin embargo, en DM, el exceso de glucosa circulante puede afectar al miocardio. La glucosa es capaz de unirse de forma inespecífica a receptores de membrana asociados a proteínas G que, a su vez, activan PKC $\beta$ . Esta isoforma disminuye la señalización de insulina (fosforila IRS-1) e induce la expresión de VEGF, IGF-1 y TGF- $\beta$ 1 [52]. Además, PKC $\beta$  podría promover la inflamación e hipertrofia cardíaca a través de la activación de NF- $\kappa$ B [53].

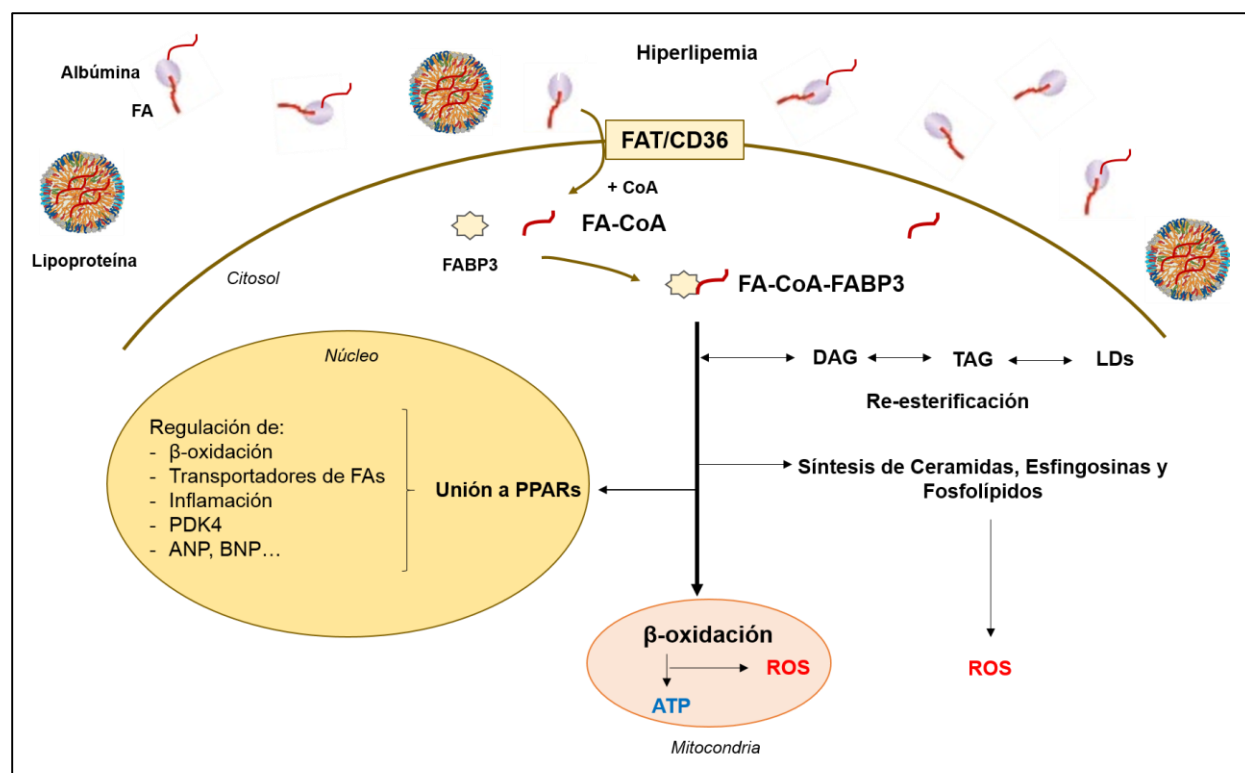


**Figura 4 – Efectos derivados de la glucotoxicidad.** La hiperglicemia crónica provoca el desarrollo de glucotoxicidad, que implica un daño estructural y funcional en los tejidos diana de la insulina. Estas alteraciones causan una reducción de la señalización de insulina y, como consecuencia, una disminución de la entrada de glucosa al cardiomiocito. El exceso de glucosa provoca la formación de AGEs que, a través de sus receptores específicos (RAGES) penetran en el cardiomiocito donde inducen procesos de fibrosis e inflamación.

El exceso de glucosa puede dar lugar, además, a la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) mediante glicación no enzimática de lípidos y proteínas de MEC, sobre todo colágenos, que se acumulan en el miocardio y en las paredes de los vasos coronarios contribuyendo a la rigidez cardíaca y disfunción endotelial [54]. La interacción de los AGEs con receptores específicos (RAGEs) juega también un papel importante en la patogénesis de la MCD promoviendo la inflamación a través de NF- $\kappa$ B (figura 4) [55]. La vía AGE/RAGE activa también TGF- $\beta$  y NADPH oxidasa, lo que causa la sobreproducción de MEC y  $O_2^-$  [56]. La glucosa en exceso también es responsable de la formación de polioles y hexosaminas. La glucosa se reduce a sorbitol que puede producir un aumento en la captación de agua debido a su capacidad osmótica, generándose así edemas. La depleción de equivalentes de reducción provoca la acumulación de fructosa que se desvía hacia la producción de glicoproteínas como la glucosamina-6-fosfato que activan factores de transcripción como Sp1, los cuales también sobreexpresan TGF- $\beta$  (figura 4) [57].

### 2.3.1.2. Lipotoxicidad

Debido a su carácter apolar, la mayoría de lípidos plasmáticos circulan unidos a apoproteínas (formando lipoproteínas) a excepción de un pequeño porcentaje de ácidos grasos libres que se transportan unidos a la albúmina (figura 5). La mayoría de los lípidos plasmáticos son TAGs y FAs no esterificados y PA, uno de los FAs saturados predominantes en la dieta, que se encuentra elevado en el plasma de pacientes obesos y DM2 [58]. La entrada de FAs al corazón puede ocurrir a través de dos mecanismos: *flip-flop* de difusión pasiva (aproximadamente el 20% de FAs) y mediante proteínas ancladas a membrana (FAT/CD36, FABPpm y FATP-1, -4 y -6) [59]. FAT/CD36 es una proteína de membrana glicosilada (88 kDa) considerada el principal transportador de FAs en el corazón [60]. FAT/CD36 humano tiene un gran dominio extracelular caracterizado por poseer diez sitios de n-glicosilación, lo que resulta en un peso que puede variar entre 80-90 kDa [61]. FAT/CD36 también es fosforilado en un residuo de treonina extracelular que afecta su unión a varios ligandos y podría incidir en su internalización y señalización [62]. En sus almacenes endosomales, la isoforma no glicosilada alcanza los 52 kDa. FAT/CD36 se localiza en dos *pools* a nivel de la membrana plasmática o sarcolema, uno asociado a los *rafts* lipídicos que son microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos en el que los FAs son transportados, y otro situado fuera de los *rafts* donde no se produce su transporte [63]. El aumento de expresión de FAT/CD36 en el sarcolema ocurre tras la contracción muscular, estimulación por insulina o activación de AMPK [64]. Una vez dentro del compartimento citosólico, los FAs son transportados con ayuda de proteínas especializadas como FABP3 hasta los diferentes destinos como la  $\beta$ -oxidación, reesterificación lipídica, formación de ceramidas y unión a PPAR.



**Figura 5 - Destinos de los FAs en la célula cardíaca.** Los FAs unidos a apoproteínas o albúmina entran en la célula a través de receptores de membrana específicos como FAT/CD36. El principal destino de los FAs en la célula cardíaca es la  $\beta$ -oxidación para la consecución de energía en forma de ATP. En condiciones de hiperlipemia y obesidad, una entrada masiva de FAs provoca la saturación de la  $\beta$ -oxidación y, como consecuencia, una acumulación de TAGs y excesiva producción de ROS que podría provocar un daño mitocondrial. Asimismo se produce una acumulación de metabolitos lipotóxicos como DAG y ceramidas.

#### 2.3.1.2.1. $\beta$ -oxidación

Una vez en el citosol, los FAs son principalmente activados (esterificados) mediante un enlace tioéster con la coenzima A en FA-CoA de cadena larga, por la ACS y transportados a través de un sistema lanzadera (sistema carnitina) al interior de la mitocondria vía Cpt-1b para ser degradados por  $\beta$ -oxidación (figura 5), proceso en el que un carbono en posición  $\beta$  es oxidado en cada vuelta del ciclo, produciendo acetil-CoA. El acetil-coA entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la producción de equivalentes de reducción como  $\text{NADH}^+$  y  $\text{FADH}_2$ , que se utilizan en la cadena respiratoria para producir ATP a partir de  $\text{O}_2$  (figura 5). Las proteínas ACADs [de cadena media (m) y larga (l)] son una familia de enzimas que catalizan la oxidación de diversos componentes FA-CoA. Si la disponibilidad y transporte de FAs excede la tasa de  $\beta$ -oxidación, se produce un acúmulo de FA-CoA, principalmente de cadena larga, reesterificándose y depositándose en *lipid droplets* (LD), y derivándose a DAGs y ceramidas [65]. En MCD, además se activa la  $\beta$ -oxidación peroxisomal, constituyendo una fuente extra de producción de ROS [66].

#### 2.3.1.2.2. Reesterificación de FAs

La reesterificación es un proceso de síntesis de TAGs como almacén energético para el cardiomiocito que podría tener un efecto protector frente a la resistencia a insulina [67]. Además, la formación de TAGs neutraliza los FAs que son perjudiciales para la célula en estado libre. La síntesis de

TAGs comienza con la acilación del glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) por acil CoA, reacción catalizada por la enzima GPAT-1 y que constituye el paso limitante en la síntesis [68]. A continuación se produce una acilación adicional para generar DAG, que es de nuevo acilada para formar TAG, reacción catalizada por la enzima DGAT-1 (figura 5). DAG es un metabolito lipídico que puede actuar como segundo mensajero de la señalización intracelular, comportándose como activador alostérico de las isoformas de PKC que inactivan la señalización de insulina. En obesidad y DM2, debido a una sobrecarga de lípidos, los DAGs también se pueden acumular en diferentes compartimentos celulares donde interfieren con la cascada de señalización de insulina [69]. Un exceso de FAs y TAGs puede derivarse hacia la formación de intermediarios lipotóxicos como las ceramidas (figura 5).

#### 2.3.1.2.3. Formación de ceramidas

Los FA-CoAs pueden ser asimilados de forma rápida formando complejos como los fosfolípidos y, sobre todo, esfingolípidos (ceramidas y glicosilceramidas) en el retículo endoplásmico [16]. Los FAs son transformados en esfingolípidos por la enzima SPTLC2 y activan serin-treonin-quinisas como PKC, JNK o IKK. El exceso de ceramidas y TAGs también induce apoptosis en MCD a través de la activación de caspasa-3 y Bax, y formación de poros mitocondriales [70].

#### 2.3.1.2.4. Unión a PPARs

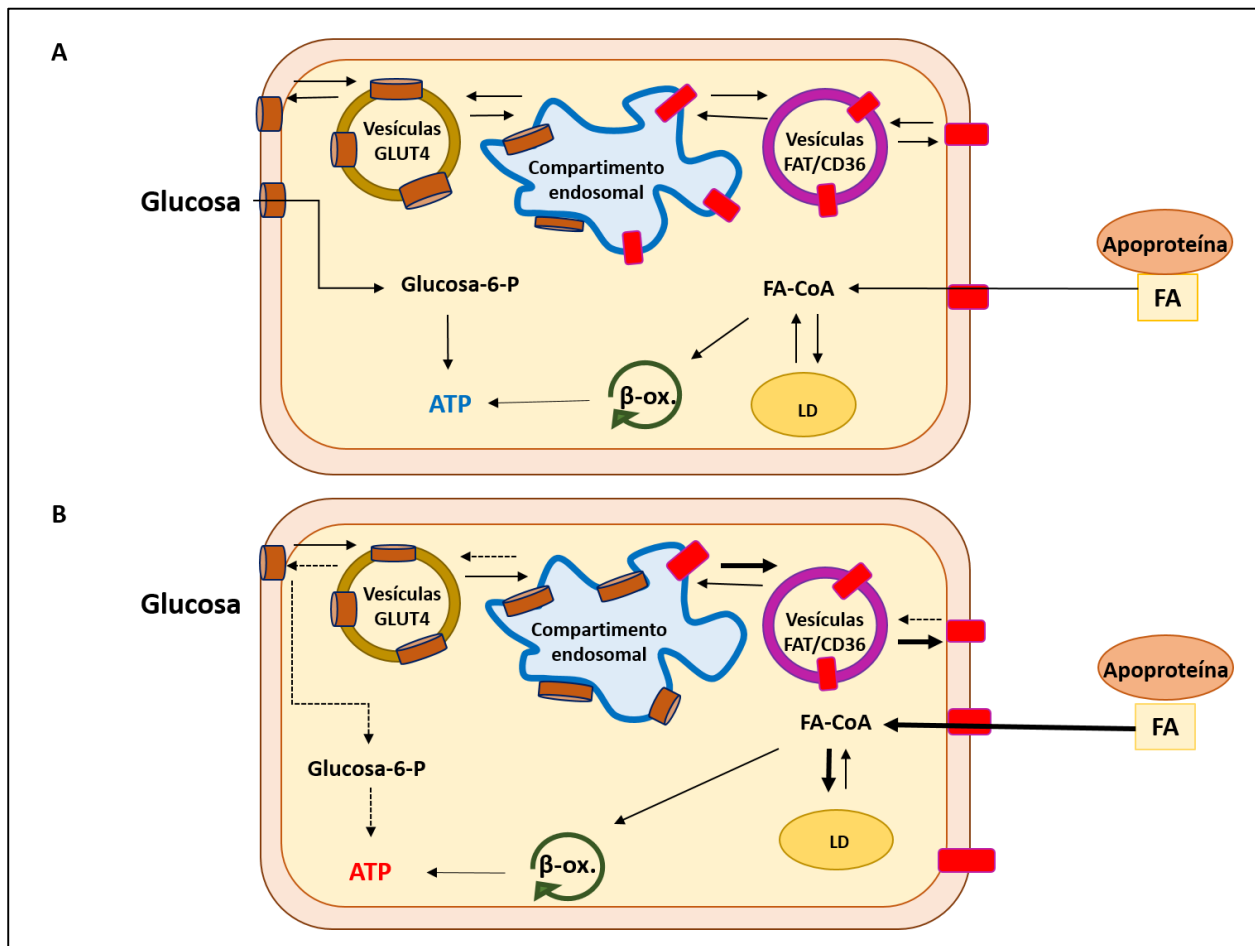
Los FA-CoAs también pueden ser transportados al núcleo del cardiomiocito (figura 5). De las 5 superfamilias de receptores nucleares que se unen a FA-CoAs, sólo los PPAR son receptores regulados por ligando [71]. Los PPAR son factores de transcripción que comprenden 3 diferentes isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$  [72]. PPAR $\alpha$  y  $\beta/\delta$  se expresan abundantemente en corazón, mientras que PPAR $\gamma$  está presente de forma predominante en el tejido adiposo. PPAR $\alpha$  regula genes implicados en la entrada de FAs (ej: FAT/CD36, FATPs), tioesterificación a acil-CoA (ej: ACSL), transporte citosólico (ej: FABP3) y  $\beta$ -oxidación peroxisomal y mitocondrial (ej: ACADs) [73]. PPAR $\alpha$  también reduce la utilización de glucosa a través de la sobreexpresión de la enzima PDK4 [74]. PPAR $\beta/\delta$  posee un papel importante en el corazón, donde ejerce funciones similares a PPAR $\alpha$ , aumenta el catabolismo de los FAs y mejora la sensibilidad a insulina [75]. PPAR $\beta/\delta$  además juega un papel importante en inflamación, ya que controla la expresión de proteína C reactiva [76] e inhibe la excesiva producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de NF- $\kappa$ B a través de ERK1/2 [77]. Se ha observado también un efecto anti-hipertrófico por reducción de la expresión de angiotensina-II (Ang-II) y así, menor ANP y BNP [75]. El efecto anti-inflamatorio de PPAR $\beta/\delta$  podría deberse también al bloqueo de otros factores nucleares como NFAT o AP-1 mediante impedimento físico [76].

### 2.3.2. Desregulación del metabolismo energético en la MCD

El origen de las alteraciones estructurales y funcionales en la MCD podría radicar en la alteración de los sustratos energéticos disponibles para el corazón [66]. Los cardiomiocitos son capaces de metabolizar un gran espectro de sustratos. De forma mayoritaria utilizan FAs ( $\approx 70\%$ ) y glucosa ( $\approx 30\%$ ), y en menor medida, lactato y cuerpos cetónicos. La localización de transportadores de glucosa y FAs en el sarcolema es el principal regulador de la utilización de estos sustratos [78]. Bajo condiciones basales, los transportadores de glucosa y FAs están sometidos a un continuo reciclaje en vesículas endosomales que



se desplazan entre el sarcolema y los compartimentos intracelulares (figura 6). La insulina es el principal efector de la utilización de sustrato cardíaco, regulando tanto la asimilación de glucosa como de FAs a través de Glut4 y FAT/CD36, respectivamente. La contracción del cardiomiocito también constituye un estímulo para la translocación de Glut4 y FAT/CD36 al sarcolema, pero este paso está mediado por el aumento de los niveles de AMPc y  $\text{Ca}^{++}$  que actúan como segundos mensajeros y activan a AMPK, PKA, PKC, PKD y ERK1/2 [79]. En DM se produce una reducción del metabolismo de glucosa y lactato de forma paralela a un aumento del metabolismo de FAs [80].



**Figura 6 - Diferencias en la utilización de sustrato energético entre el corazón sano y DM2.** El corazón sano (A) obtiene la mayor parte de la energía a partir de la oxidación de FAs y un 30% a partir de la oxidación de la glucosa. (B) Bajo condiciones de DM2 y resistencia a insulina, se produce una alteración en la utilización de sustratos, asimilando FAs prácticamente como única fuente energética en detrimento de glucosa.

El miocardio DM presenta un defecto en la translocación de Glut4 al sarcolema y, en consecuencia, una reducción en la entrada de glucosa que propicia un aumento compensatorio en la entrada y metabolismo de FAs vía FAT/CD36, el cual es menos efectivo que la glucosa [81]. Esta relocalización de FAT/CD36 en el sarcolema parece ser un evento temprano como consecuencia de cambios maladaptativos en el corazón DM2, llevando a inflexibilidad metabólica, lipotoxicidad y desarrollo de MCD [82]. Son varias las señales extracelulares y proteínas asociadas al tráfico de estas vesículas. El ciclo de Randle describe la relación recíproca entre el metabolismo de FAs y el de la glucosa. El acetil-CoA derivado de la oxidación

de la glucosa se exporta al citosol, donde actúa como sustrato para la acetil-CoA carboxilasa para la síntesis de malonil-CoA, un inhibidor endógeno de CPT-1, descendiendo así la tasa de  $\beta$ -oxidación de FAs. Por otro lado, el aumento de los equivalentes de reducción y acetil-CoA procedentes de la  $\beta$ -oxidación disminuye la oxidación de glucosa/piruvato por inhibición de la PDH, así como por el efecto inhibitorio del citrato sobre la fosfofrutoquinasa. Por tanto, el metabolismo de glucosa y FAs podrían estar yuxtapuestos en MCD [66]. De modo interesante, un cambio en la utilización de sustrato hacia la oxidación de la glucosa podría mejorar la disfunción cardíaca asociada a DM2 [83].

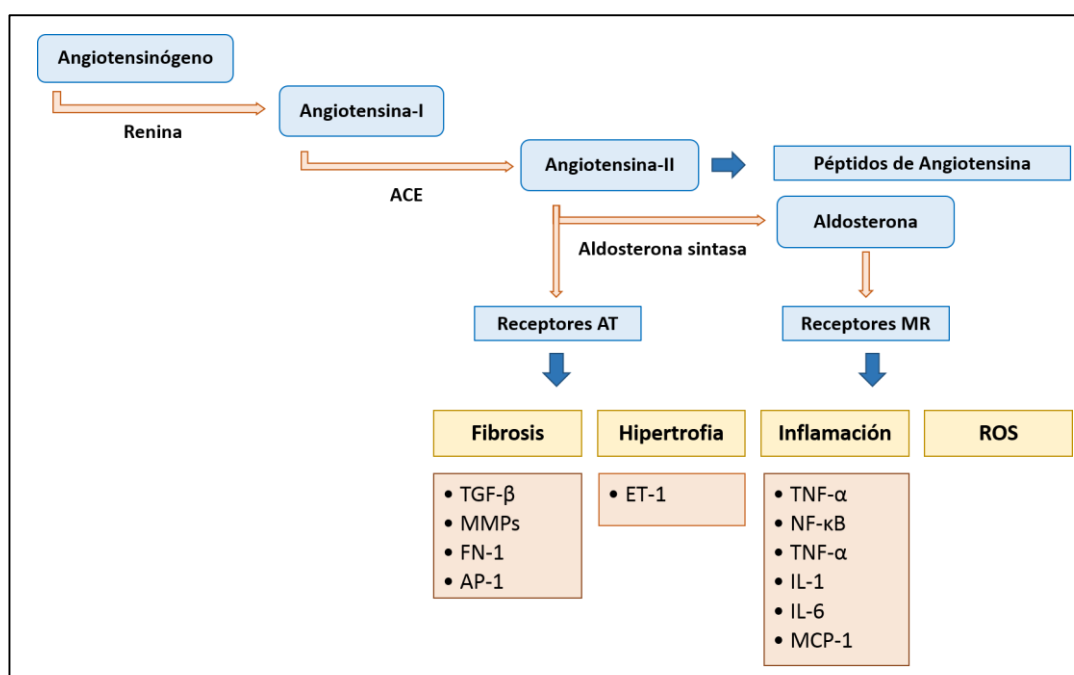
### 2.3.3. Estrés oxidativo en MCD

En el cardiomiocito la producción de ROS en citosol y mitocondria se debe principalmente a cuatro sistemas enzimáticos: NOX, xantina oxidasa, NOS y cadena respiratoria mitocondrial [84]. La función mitocondrial es particularmente importante en el corazón ya que proporciona aproximadamente el 90% del ATP del miocardio [85], pero es la mayor fuente de ROS [86]. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la formación y degradación de ROS, que incluyen radicales libres  $\text{OH}^\cdot$  y  $\text{O}_2^\cdot$ , y radicales no libres como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o HOCl. Existen además sistemas detoxificantes como la SOD, HO-1, GPox y catalasa, así como sistemas antioxidantes no enzimáticos como ferritina, transferrina y vitaminas A, E y C [87]. La acumulación de ROS provoca el descenso en el gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial que reduce la producción de ATP, provocando la aparición de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), proceso donde se libera el citocromo-c que induce apoptosis [65]. Este hecho recibe el nombre de desacoplamiento mitocondrial, que provoca que el corazón sea menos eficiente, lo que podría contribuir al desarrollo de disfunción contráctil cardíaca en MCD. Además, el  $\text{Ca}^{++}$  citosólico entra de forma masiva en la mitocondria donde se almacena indebidamente, contribuyendo al desacoplamiento. ROS y en particular el  $\text{O}_2^\cdot$  pueden dañar también la mitocondria y otros componentes celulares mediante la oxidación de proteínas, convirtiendo lípidos en peróxidos lipídicos reactivos, aumentando la nitración de las tirosinas y la formación de AGEs, y afectando al DNA mitocondrial y a factores de transcripción [88]. Entre ellos NRF-1, regulador directo de genes de la función respiratoria, fosforilación oxidativa y biogénesis, y Tfam, implicado en el mantenimiento, replicación y transcripción del DNA mitocondrial [89]. El daño mitocondrial manifestado por la reducción de la biogénesis mitocondrial podría ser consecuencia de la progresión de la patología cardíaca y de la apoptosis del cardiomiocito [90]. PGC-1 $\alpha$  se expresa de forma selectiva en tejidos con alta capacidad oxidativa como el corazón donde juega un papel importante en los procesos metabólicos energéticos celulares, como la biogénesis mitocondrial o la oxidación [91]. PGC-1 $\alpha$  coactiva PPAR $\alpha$  aumentando la expresión de genes implicados en la entrada y oxidación de FAs [92]. El estrés oxidativo puede ser además incrementado en MCD por la desestabilización del retículo endoplásmico. La mayoría de las proteínas maduran en el lumen del retículo endoplásmico pero en condiciones de DM2 y obesidad, el incremento de lípidos puede estimular el flujo de proteínas desensambladas al retículo, lo que puede originar una respuesta desacomplante [93].



## 2.4. Implicaciones del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) en la MCD

Las alteraciones anteriormente descritas tienen en común la participación de RAAS (figura 7), un eje endocrino fisiológico que desempeña un papel clave en la regulación del volumen sanguíneo, la resistencia vascular sistémica y el balance electrolítico, siendo el principal regulador homeostático de la función cardíaca [94]. Además del circulante existe un sistema local RAAS en órganos como el corazón y la sobre-activación de RAAS cardíaco se ha reconocido como un factor determinante en el desarrollo y progresión de la MCD [95]. La Ang-II es un péptido activo del sistema RAAS que se une a los receptores AT y estimula la vasoconstricción, proliferación de las células musculares lisas e hipertrofia miocárdica [96]. Ang-II está reconocida como una citoquina con papel en remodelado cardiovascular. Su unión a AT1 ejerce la mayoría de sus acciones biológicas, mediante la activación de múltiples vías de señalización celular que participan en crecimiento celular y migración, producción de MEC e inflamación. A través de su unión a AT2, Ang-II regula el control de la presión sanguínea, la natriuresis e inhibe el crecimiento celular activando factores de transcripción como AP-1, STAT y NF- $\kappa$ B. En fibrosis, Ang-II juega un papel crítico en la enfermedad cardiovascular siendo capaz de inducir la acumulación de colágenos, aumentar la proliferación de fibroblastos, y estimular TGF- $\beta$ , AP-1 y ET-1 [97].



**Figura 7 - Participación del sistema RAAS en el desarrollo de la MCD.** La renina se libera en respuesta a la reducción de la volemia o presión arterial (entre otros estímulos) y actúa sobre el angiotensinógeno transformándolo en Ang-I. Ésta es degradada a su vez en Ang-II por medio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La aldosterona es un mineralocorticoide que se sintetiza a partir del colesterol por la aldosterona sintasa en una reacción activada por la Ang-II e inducción de PLC, DAG e IP3. Ambos péptidos, AngII y aldosterona inducen la expresión de genes pro-hipertrofos, -fibróticos y -oxidantes/inflamatorios.

La aldosterona es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides que posee marcados efectos sobre el sistema cardiovascular alterando la expresión génica e influenciando el tono vascular, contractilidad miocárdica y composición del miocardio. Actúa como mediador de los efectos

deletéreos de Ang-II en el miocardio diabético y su inhibición reduce la muerte e hipertrofia celular, la inflamación y la producción de MEC [98]. La aldosterona compite con el cortisol por la unión al receptor mineralocorticoide (MR), y, una vez unido, induce su internalización, ejerciendo efectos genómicos y no genómicos. MR es miembro de una familia de factores transcripcionales de receptores de hormonas esteroideas, que comparte características estructurales con receptores de glucocorticoides, progesterona y andrógenos. Las acciones deletéreas de la aldosterona en el corazón parecen cursar a través del MR del cardiomiocito [99, 100]. Los efectos no genómicos ocurren en cuestión de minutos, como el fenómeno de vasoconstricción, activación de segundos mensajeros (AMPc, DAG...) y cascadas de protein-quinasas. Los efectos “clásicos” de aldosterona se deben a la regulación de genes implicados en homeostasis, apoptosis, inflamación/oxidación y fibrosis (figura 7). Estos efectos son similares a los descritos para Ang-II y tienen una duración de horas a días. La aldosterona, además, agrava la fibrosis cardíaca mediante la activación de metaloproteinasas (MMPs) así como la deposición de colágeno y elastina [99]. MR también induce CTGF [101] y aumenta TGF- $\beta$ , que, a su vez, participa en el desarrollo de hipertrofia. Los péptidos natriuréticos ANP y BNP tienen efecto anti-hipertrofico e inhibidor de la secreción de renina y la síntesis de aldosterona, sin embargo, en condiciones de MCD, bajo sobreactivación del sistema RAAS, la respuesta fisiológica a estos péptidos disminuye a medida que la función cardíaca empeora, incluso si las concentraciones plasmáticas de los péptidos se ven aumentadas [102]. Respecto a su papel en inflamación, niveles elevados de aldosterona son inductores de NF- $\kappa$ B y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  [103]. Por otra parte, MR promueve la apoptosis en cardiomiocitos a través de las vías extrínseca e intrínseca, siendo empeorado este efecto por la presencia de comorbilidades como obesidad e hiperlipemia [104]. En cuanto a sus efectos en esteatosis, existen evidencias de la asociación entre DM, obesidad y niveles elevados de aldosterona [105]. Finalmente, la aldosterona potencia la síntesis de Ang-II, promoviendo aún más sus acciones deletéreas en el corazón DM2 [106].

### 3. Diagnóstico de la MCD

Existen varios métodos de diagnóstico para detectar las anomalías debidas a alteraciones estructurales y funcionales cardíacas en DM. Éstas incluyen técnicas no invasivas como la resonancia magnética, ecocardiografía, tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) y tomografía de emisión de positrones (PET).

#### 3.1. Ecocardiografía

Es un método eficaz para la determinación de los grosores de las paredes y septos de las cavidades, y la función miocárdica tanto sistólica como diastólica [107] mediante imágenes del corazón en 2D. Sin embargo, la ecocardiografía convencional ha generado cierta controversia ya que tiende a infravalorar los patrones de llenado del VI. Esto hace que aproximadamente un 50% de los pacientes con disfunción diastólica no sean diagnosticados correctamente. Mediante Eco-Doppler se puede estudiar además el flujo y velocidad sanguínea. Permite también el estudio de la función valvular y los valores obtenidos son independientes de los cambios en el llenado o carga del VI. Eco-Doppler cuantifica tanto la contracción cardíaca longitudinal como circunferencial que son reflejo de la integridad de la contracción de las fibras miocárdicas y subendocárdicas [108].

### 3.2. Resonancia magnética y tomografía computerizada

La resonancia magnética utiliza imanes y potentes ondas de radio para crear imágenes de un órgano o tejido determinado. No emplea radiación ionizante sino campos magnéticos para alinear la magnetización de los núcleos de hidrógeno que contiene el H<sub>2</sub>O corporal. Mediante estudios *in vivo* con resonancia magnética se ha confirmado un incremento del contenido de TAG intramiocárdico, fibrosis y disfunción cardíaca asociada en pacientes DM2 y obesos [109]. Experimentos con resonancia magnética han demostrado que los pacientes diabéticos poseen el ratio fosfocreatina/ATP reducido, sugiriendo que el metabolismo energético podría estar alterado; sin embargo, cambios en el *pool* de creatina e incremento en la utilización de ATP, podrían también contribuir a esta observación y así, no sería adecuado para el diagnóstico de la MCD [110]. La tomografía computerizada es un procedimiento de gran resolución de diagnóstico que utiliza un equipo de rayos X especial para crear imágenes transversales de un órgano o tejido determinado. Esta tecnología ha avanzado en los últimos años hacia SPECT, que utiliza imágenes 3D del corazón y permite la valoración simultánea de la perfusión miocárdica y la función ventricular, tanto en condiciones de reposo como en respuesta al esfuerzo.

### 3.3. Tomografía de emisión de positrones (PET)

PET es una técnica de imagen que consiste en la inyección de una traza marcada radiactivamente con un nucleído emisor de positrones (molécula con actividad biológica) para el estudio de su asimilación y/o distribución en el organismo, permitiendo así medir su actividad metabólica. La aplicación de PET en animales pequeños (micro-PET) permite medidas secuenciales de las tasas metabólicas en el mismo animal [111] y, mediante análisis computacional, se construye una imagen tridimensional de la distribución de la molécula en el interior del órgano de interés. Estudios PET *in vivo* realizados en humanos DM2 han mostrado un incremento de la asimilación y oxidación de FAs de forma simultánea a una disminución en la entrada de glucosa inducida por insulina y en paralelo a una disfunción diastólica [112]. El principal problema del PET es su elevado coste y la corta vida media de algunos de los isótopos de emisión de positrones que requieren para su síntesis un ciclotrón y escáneres cercanos al lugar físico donde se realice el PET [113].

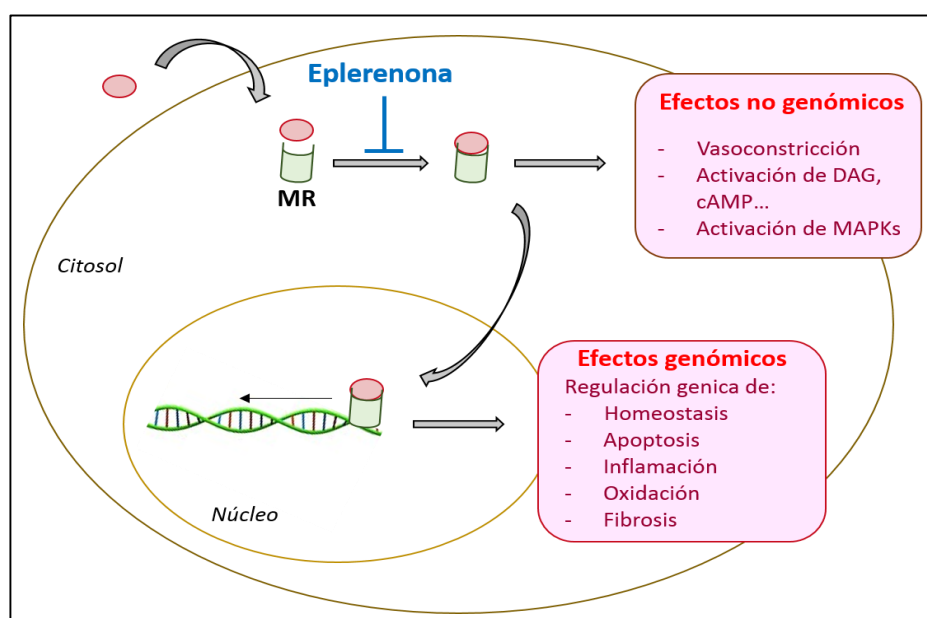
## 4. Terapéutica actual y potencial para MCD

No existe una terapia específica para la MCD, y los pacientes DM con disfunción cardíaca son tratados por su riesgo hiperglicémico y por las complicaciones cardiovasculares asociadas. Respecto a estas complicaciones, los pacientes DM reciben tratamientos anti-agregantes, anti-hiperlipemiantes y anti-hipertensivos, con el fin de evitar fenómenos de agregación plaquetaria, acumulación lipídica y aterosclerosis, y elevación de la presión arterial, respectivamente [114]. Respecto al componente glucídico, se ha demostrado que un buen control glicémico (HbA<sub>1c</sub><7%) está asociado a una menor incidencia de MCD debido a una mejora de la función tanto diastólica como sistólica. Los niveles de glucosa postprandial se encuentran entre los predictores de morbilidad y mortalidad cardiovascular [115]. Sin embargo, las complicaciones cardiovasculares crónicas y la mortalidad asociadas no parecen mejorar de forma significativa [116].

De los estudios ACCORD [117], ADVANCE [118] y VADT [119] se han obtenido una serie de recomendaciones para el tratamiento farmacológico de los pacientes DM2. Proponen un nuevo algoritmo de tratamiento que consiste en iniciar el mismo con cambios en el estilo de vida y administración de antihiperglicémicos biguanidas (véase metformina), y cambiar precozmente a nuevos regímenes terapéuticos en los pacientes que no logren el citado objetivo. En particular se establece una pauta con secretagogos como sulfonilureas, e insulina. Además, explicita de forma rotunda la exclusión del agonista de PPAR $\gamma$  rosiglitazona y, sin embargo, sitúa el uso de pioglitazona en un segundo nivel terapéutico. También adopta una postura cautelosa con los estimulantes del sistema incretina, amparándose en el desconocimiento de su seguridad cardiovascular a largo plazo [120]. Por otra parte, nada se ha estudiado del bloqueo alternativo del sistema RAAS, en particular de la aldosterona, sobre el desarrollo de la MCD.

#### 4.1. Antagonistas del receptor de mineralocorticoides

Los fármacos antagonistas del MR han demostrado efectividad en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y podrían tener un papel en el tratamiento de la MCD. El bloqueo del sistema RAAS basado en la inhibición de la ECA o de los receptores para Ang-II mejora algunos de los procesos patológicos de la MCD, como fibrosis y apoptosis del cardiomiocito. Sin embargo, dados los efectos pleiotrópicos de la Ang-II y al incremento de renina circulante en pacientes tratados con iECAs o AT1 bloqueantes, sería deseable un bloqueo más específico del RAAS, como el de los receptores MR para aldosterona. Los antagonistas de la aldosterona llevan incluidos en el armamentario del tratamiento de la insuficiencia cardiaca varias décadas. Aunque se incorporaron como ayuda para otros diuréticos más potentes, el conocimiento de las funciones de aldosterona ha colocado primero a la espironolactona y ahora a la eplerenona como uno de los pilares del tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada.

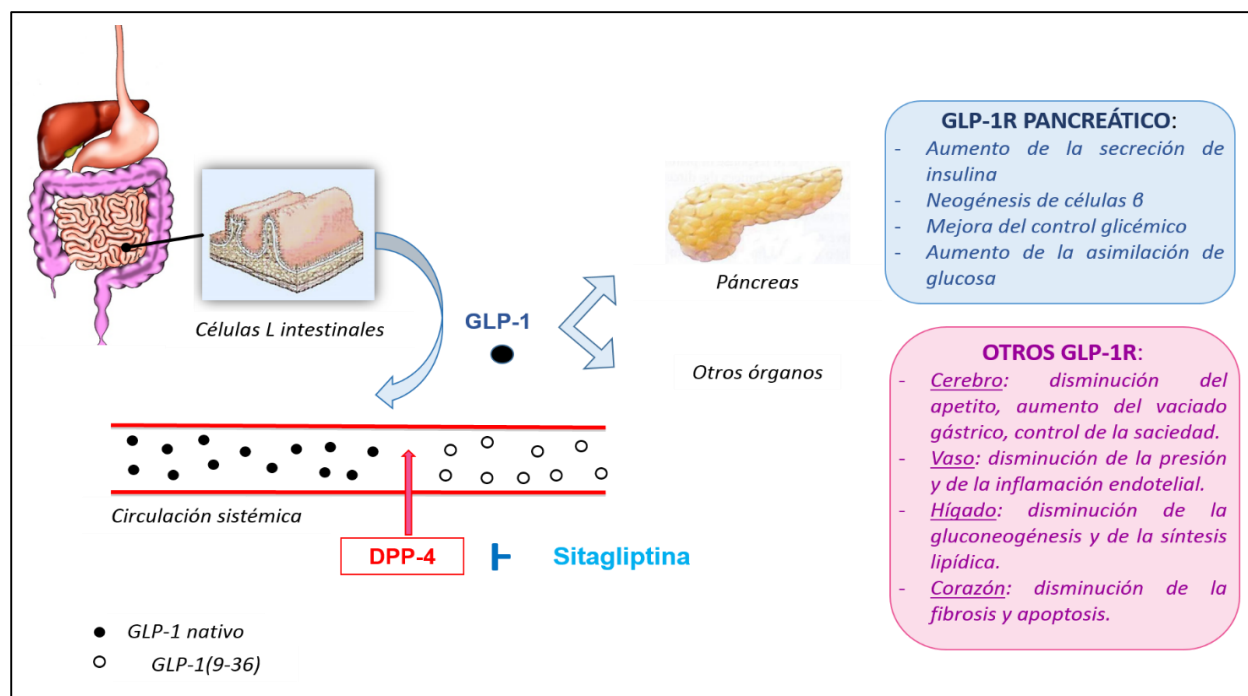


**Figura 8 - Efectos cardiosaludables de la eplerenona.** La eplerenona es la gammalactona del ácido (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ ) metiléster 9, 11-epoxi-17-hidroxi-3-oxopregn-4-eno-7, 21 dicarboxílico, perteneciente al grupo de los antagonistas de MR epoxi-esteroideos [121]. La administración de eplerenona reduce los efectos genómicos y no genómicos asociados a la activación del MR, promoviendo cardioprotección en el paciente con insuficiencia cardiaca.

El bloqueo de MR reduce la morbi-mortalidad de origen cardiovascular en distintos modelos experimentales de hipertrofia cardíaca así como en pacientes con disfunción del VI asociada a insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio [106]. Los antagonistas de MR reducen también la hipertensión y fibrosis miocárdica y vascular, mejoran la función endotelial e inhiben el estrés oxidativo (figura 8) [122, 123]. Estos efectos han sido confirmados en el estudio EPHESUS (*Eplerenone Post-acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) en el que la eplerenona mejoró la disponibilidad de NO y la captación miocárdica de noradrenalina, y redujo las concentraciones de catecolaminas circulantes, actividad NAD(P)H oxidasa y producción de ROS en pacientes con insuficiencia cardíaca. Además, la eplerenona disminuyó la activación de Ang-II y ET-1 en el tejido miocárdico, lo que promovió la reducción de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas pro-inflamatorias [124].

#### 4.2. Estimulantes del sistema incretina

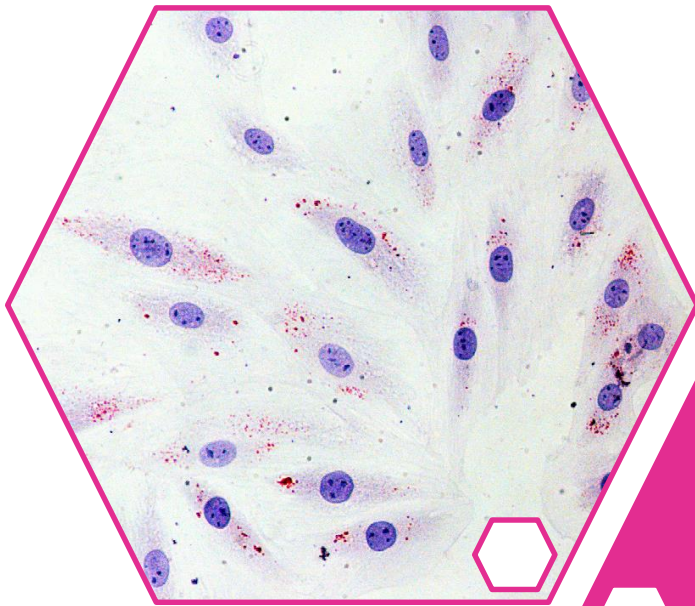
GLP-1 es la principal incretina secretada por las células-L intestinales en respuesta a estímulos nutricionales. GLP-1 circulante se une a su receptor específico GLP-1R que se expresa en células  $\beta$ -pancreáticas incrementando su proliferación y secreción de insulina (e inhibiendo la liberación de glucagón), mejorando así el metabolismo postprandial de la glucosa (figura 9) [125]. Se ha demostrado además la existencia de GLP-1R extrapancreático, como en el corazón, hígado, vaso, estómago, etc, lo que sugiere efectos directos de las incretinas. Sin embargo, no existen muchas evidencias de su efecto directo sobre el corazón. Además, la vida media de GLP-1 es muy corta (2 minutos aproximadamente) debido a su degradación por la enzima DPP-4 (figura 9).



**Figura 9 - Mecanismo de acción de GLP-1 y sitagliptina.** GLP-1 es sintetizada por las células-L intestinales en respuesta a la ingesta nutricional y viaja a través de la circulación hasta llegar a órganos diana, donde se une al GLP-1R ejerciendo diferentes acciones. Sin embargo, GLP-1 es degradado rápidamente por la enzima DPP-4. La sitagliptina [(R)-4-oxo-4-[3-(trifluorometil)-5,6-dihidro [1, 2, 4] triazolo [4, 3, a] pirazin-7 (8H)-il]-1-(2,4,5-trifluorophenil)-butan-2-amina], inhibe la acción de la DPP-4 aumentando la concentración de GLP-1 y mejorando el control glicémico.

Existen en el mercado drogas que, bien mimetizan el péptido GLP-1 sobre su acción en el GLP-1R, o bien inhiben la actividad de la DPP-4 [126]. Estos últimos producen una reducción del 80% de la enzima y un incremento de 2 veces la cantidad de GLP-1 circulante [127]. En particular, la sitagliptina, que ha sido aprobada recientemente para su uso en la práctica clínica, produce una reducción de la hiperglicemia e insulino-resistencia, y mejora de la enfermedad cardiovascular en pacientes diabéticos [128]. En nuestro grupo previamente estudiamos el efecto de sitagliptina sobre los principales eventos patológicos activados en MCD. La sitagliptina mostró un efecto hipoglicemiante y antilipemiante, y redujo la resistencia a insulina. Además, indujo acciones directas en el corazón, potencialmente debidas a la unión de GLP-1 sobre el GLP-1R del cardiomiocito, mejorando los procesos de apoptosis, necrosis, hipertrofia y fibrosis cardíaca [30]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en estas acciones.





## *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*





## 1. Hipótesis

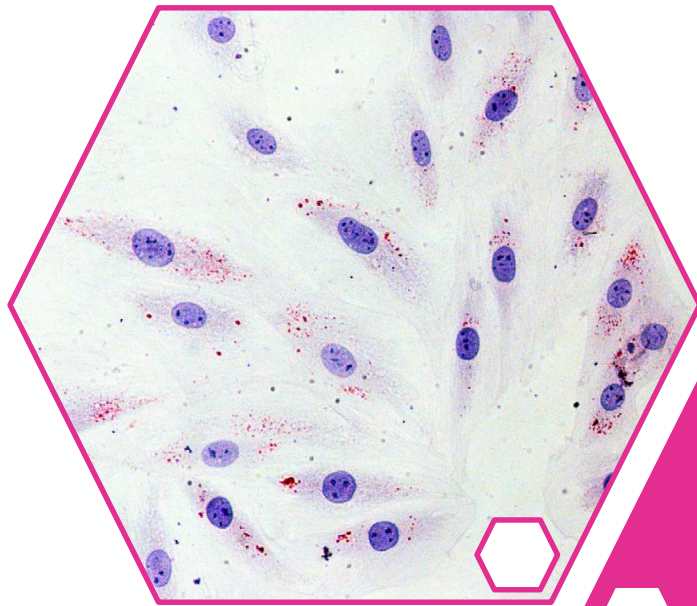
La DM2 induce alteraciones en el miocardio incluídos procesos de esteatosis, apoptosis, fibrosis e hipertrofia. La activación de estos eventos puede originar disfunción diastólica y/o sistólica y, a más largo plazo, fallo cardiaco en el paciente. Sin embargo no existe una terapia eficaz y específica para esta patología. La unión aldosterona/MR constituye un proceso clave en la génesis de los procesos citados y así, el bloqueo de los receptores MR podría atenuar estas respuestas. El efecto anti-hipertrófico y anti-fibrótico tras la administración de eplerenona (bloqueante de los MR) se ha demostrado en pacientes con insuficiencia cardiaca o infarto de miocardio, pero no se conoce su papel en el proceso esteatótico ni en la consiguiente muerte celular. Además, una de las alteraciones iniciales tras el establecimiento de la DM2 podría consistir en un cambio en la utilización de sustrato energético hacia un mayor uso de ácidos grasos. Nosotros hipotetizamos que una reversión de este efecto podría mejorar el desarrollo de la miocardiopatía diabética. En este sentido, el tratamiento con un inductor del sistema incretina, como los inhibidores de la DPP-4, podría además de mejorar la resistencia a insulina, actuar directamente sobre el cardiomiocito y regular la translocación al sarcolema de receptores para glucosa y ácidos grasos, y reducir la formación de productos lipotóxicos.

## 2. Objetivos

En esta tesis pretendemos dos objetivos principales:

- 1) Estudiar el efecto del bloqueo de receptores de mineralocorticoides por eplerenona en un modelo experimental de DM2 y obesidad:
  - Sobre la apoptosis y esteatosis miocárdica asociadas.
  - Profundizando en los mecanismos celulares subyacentes a estos efectos mediante estudios en cardiomiocitos en cultivo.
- 2) Analizar el efecto de la administración de un inhibidor de DPP-4 (sitagliptina) sobre la asimilación de glucosa cardiaca en un modelo experimental de DM2:
  - Investigando el efecto del tratamiento en la distribución de los receptores de glucosa (Glut4 y Glut1) y FAs (FAT/CD36).
  - Analizando los fenómenos subsiguientes de oxidación, reesterificación y formación de productos lipotóxicos.





## *MATERIALES Y MÉTODOS*

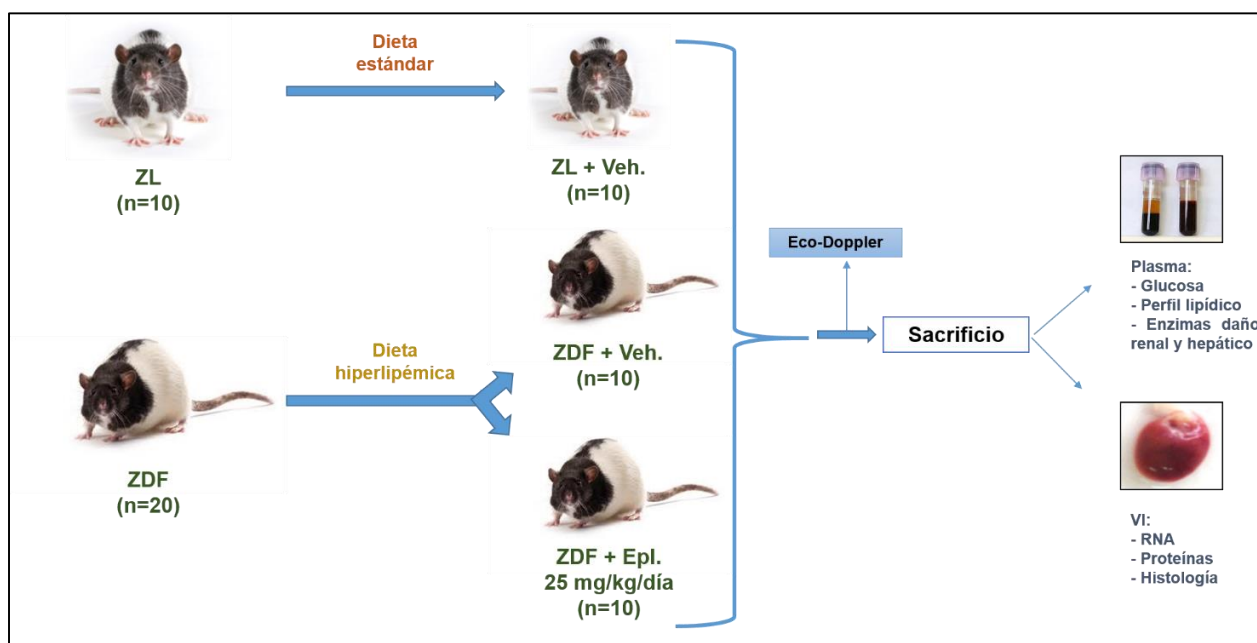


## 1. Modelos animales

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos modelos crónicos de ratas DM2 no hipertensas:

### 1.1. Zucker Diabetic Fatty

Las ratas ZDF (Charles Rivers, Francia) desarrollan obesidad e hiperlipidemia (niveles elevados de lipoproteínas, Ch y TAGs en plasma) debido a la mutación *fa* en el dominio extracelular del receptor de la leptina y a la administración de dieta hiperlipidémica [129]. La anomalía de la señalización de leptina, altera la supresión del apetito y la termogénesis e induce obesidad y DM2, lo que asemeja estrechamente la progresión de la enfermedad en humanos, en la que un estado hiperinsulinémico-euglicémico conduce a otro hiperglicémico y deficiente en insulina con desarrollo de hiperfagia, poliuria y polidipsia [130]. A las 12 semanas de edad las ratas ZDF son, además, resistentes a insulina e incrementan la severidad de la DM2 según crecen [131]. En nuestro caso, las ratas ZDF (machos) permanecieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (7 a.m.-7 p.m.) a 25°C y con libre acceso a agua y comida grasa (Purina 5008; compuesta por 16,7% grasa, 26,8% proteínas y 56,4% carbohidratos). Además, utilizamos un grupo de ratas control Zucker Lean [ZL (*fa*<sup>+</sup>/*fa*<sup>+</sup>), n=10] que recibió dieta estándar. Una vez confirmadas la obesidad y DM2 (hiperglicemia y resistencia a insulina) a la semana 14, se evaluó la estructura y función cardiaca, sin evidencia de cambios significativos entre ZDF y ZL. Las ratas ZDF fueron aleatoriamente divididas en dos grupos (n=10, cada uno), recibiendo uno de ellos eplerenona (Pfizer, USA) a una dosis de 25 mg/Kg peso corporal/día disuelta en agua y administrada a través de sonda oral, y el otro, vehículo, también a través de sonda oral. El grupo ZL recibió vehículo del mismo modo (figura 10).

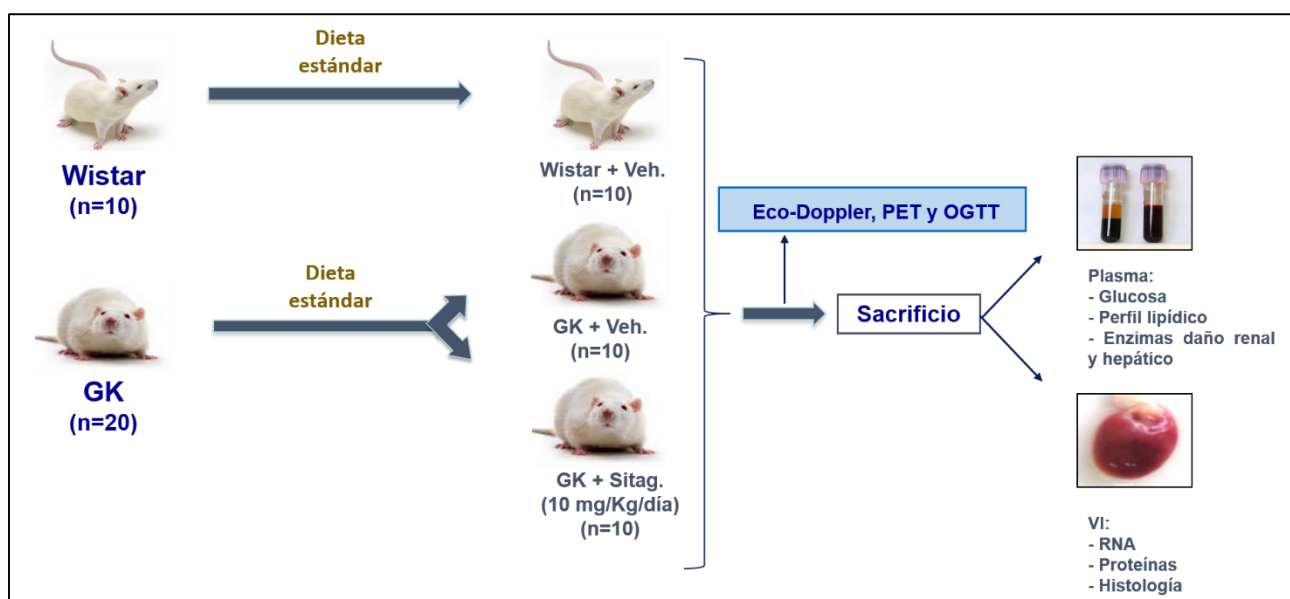


**Figura 10 - Modelo experimental de obesidad y DM2.** Las ratas ZDF o ZL fueron tratadas con eplerenona o vehículo, respectivamente, durante 16 semanas. Tras el sacrificio, corazones y plasmas fueron aislados para posteriores análisis. Epl.: eplerenona; veh.: vehículo.

Durante el desarrollo del modelo se monitorizaron semanalmente los pesos corporales y el consumo de comida. Además, la presión arterial sistólica se midió mensualmente en los animales por el método *tail-cuff*. Transcurridas 16 semanas de tratamiento se realizó un segundo examen ecocardiográfico con el fin de observar potenciales variaciones. Finalmente, los animales se mantuvieron durante 24 horas en jaulas metabólicas para la obtención de muestras de orina. Seguidamente fueron sacrificados por desangrado desde la vena cava inferior bajo anestesia (2,5% isoflurano-O<sub>2</sub>) [Forane; Abbott, Illinois (USA)]. Tras abrir el tórax, los corazones se perfundieron con suero salino frío por goteo desde el VI, previamente a su extracción. A continuación se aislaron, se eliminó el exceso de suero, y pesaron. Se desecharon las aurículas, y los ventrículos se dividieron en tres secciones transversales; la superior se incluyó en medio de crio-preservación Optimal Cutting Temperature (OCT, Tissue-Tek, Alemania) para estudios de histología, la siguiente se embebió en solución salina al 4% de paraformaldehído (PFA) para su inclusión en parafina, y la región inferior libre de pared posterior de ventrículo derecho se congeló en N<sub>2</sub> líquido para ensayos de cuantificación proteica y de RNAm. La sangre obtenida se centrifugó 15 minutos a 2.000 rpm para el aislamiento de plasma en tubos con anticoagulante EDTA [Becton Dickinson (BD)]. Se midieron los niveles plasmáticos de glucosa, lípidos, iones y marcadores de daño severo renal y hepático en el servicio de análisis bioquímicos del hospital. En las muestras de orina se determinó la proteinuria a partir del método Exton [132]. Se evaluó además la longitud del fémur en cada animal para relativizarlo al peso seco del corazón.

### 1.2. Goto-Kakizaki

Las ratas GK (Taconic, Dinamarca) se obtienen por cruzamientos repetidos de ratas wistar seleccionadas por su limitada tolerancia a glucosa. GK desarrollan DM2 a las 14 semanas de edad debido a polimutaciones e interacciones de múltiples anomalías metabólicas gestacionales que inducen la pérdida de masa celular  $\beta$ -pancreática [133]. GK reproduce las principales características de la DM2 humana: hiperglicemia en ayunas, intolerancia a la glucosa, deterioro de la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica a la misma y alteraciones en el metabolismo lipídico, constituyendo un modelo apropiado para el estudio de la DM2 *per se*, sin la influencia de obesidad o hipertensión. Las condiciones de crecimiento y mantenimiento fueron similares a las del modelo ZDF. Sin embargo, una vez establecida la DM2 y resistencia a insulina esperamos hasta la observación de disfunción cardíaca mediante ecocardiografía (semana 25). Entonces las ratas GK se trataron con sitagliptina [Merck Sharp & Dohme, España] a 10 mg/Kg peso corporal/día disuelta en agua ó vehículo (n=10, cada uno) mediante sonda oral (figura 11). Un grupo de ratas Wistar a las que se suministró agua como vehículo ejerció como grupo control. Basándonos en previa experiencia [30], el tratamiento se prolongó 20 semanas, momento en el que observamos una mejora de la función cardíaca, para realizar entonces un estudio de PET y un test de tolerancia a glucosa (OGTT) (figura 11). Las condiciones de sacrificio, aislamiento y procesamiento de los corazones y plasmas fueron iguales a las empleadas en el modelo ZDF.



**Figura 11 - Modelo experimental de DM2.** Las ratas GK y Wistar fueron tratadas con sitagliptina o vehículo respectivamente durante 20 semanas. Al finalizar el modelo los corazones y plasmas fueron aislados para posteriores estudios. Sitag: sitagliptina; veh.: vehículo

Los modelos animales experimentales se realizaron de acuerdo a la normativa internacional vigente (Real Decreto 1201/2005, BOE número 268 Ley 32/2007) y fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del IIS-Fundación Jiménez Díaz.

## 2. Estructura y función cardíaca

Antes y después del tratamiento con eplerenona y sitagliptina en cada modelo, las ratas se anestesiaron con 1,5% isoflurano-O<sub>2</sub> para evaluar por ecocardiografía su estructura y función cardíaca en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (U.C.M) a cargo de la Dra. Caro-Vadillo. Se utilizó un ecocardiógrafo Eco-Doppler (En Visor-C-HD, Phillips) de 12 MHz. Las imágenes se obtuvieron en posición decúbito supino (vista parasternal izquierda) a partir del modo-M, y se registraron los siguientes parámetros:

- Grosos de las paredes [septo interventricular (IVS) y pared posterior del VI (LVPW)].
- Diámetros del VI en sístole (LVSD) y en diástole (LVDD).
- Fracción de eyección (EF, método *Teichholz*).
- Tiempo de desaceleración (Dec. T).
- Velocidades temprana (E) y tardía (A) de llenado del VI.

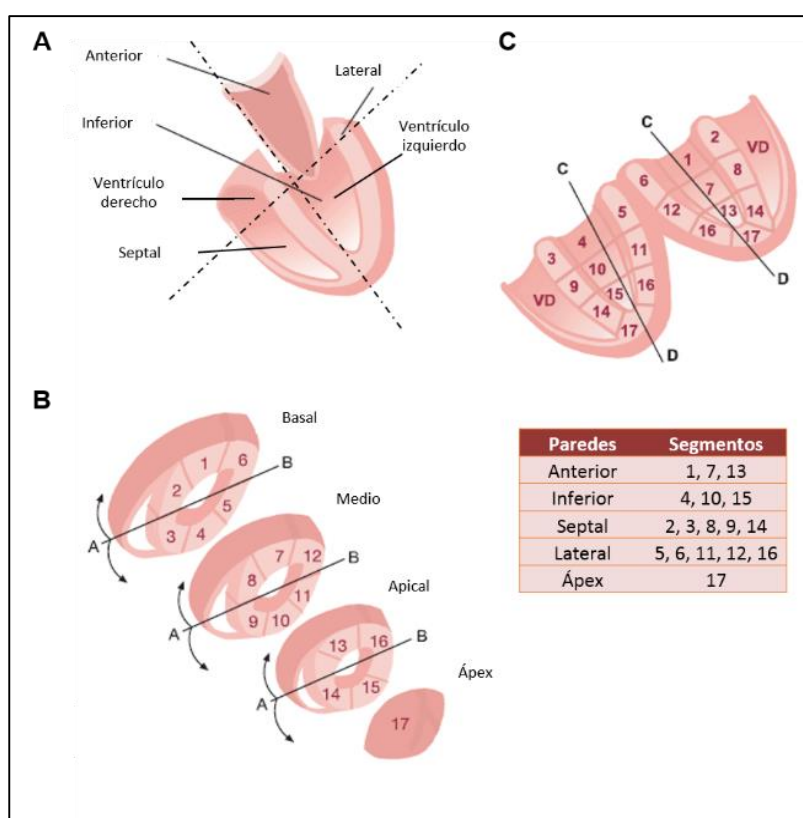


### 3. Micro-PET

Para el estudio del metabolismo glucídico en la MCD se utiliza la [ $^{18}\text{F}$ ]-2-fluoro-deoxy-D-glucosa ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG), un análogo de glucosa que traza la entrada y fosforilación de la glucosa exógena *in vivo*. El micro-PET se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Energéticas, MedioAmbientales y Tecnológicas (C.I.E.M.A.T.) en Madrid, en colaboración con el Dr. Morcillo mediante inyección de glucosa radiactiva [ $^{18}\text{F}$ ]-2-fluoro-deoxy-D-glucosa ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) a las ratas del modelo GK. Cuando [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG entra en el miocardio es fosforilada a [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-6-fosfato, lo que imposibilita su acceso a la glicolisis, quedando atrapada [134]. Químicamente, [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG es un análogo de la glucosa con el isótopo radiactivo fluorina-18 que sustituye al grupo hidroxilo en posición 2' de la molécula de glucosa. [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG posee un periodo de semidesintegración de 110 minutos [135] y, al igual que la glucosa, se asimila pasando al citosol celular donde es fosforilado a [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-6-fosfato por la acción de la enzima hexoquinasa. Después queda atrapado impidiendo su degradación. Este fenómeno se utiliza para estimar la entrada de glucosa al tejido y su tasa de asimilación estándar (SUV), que mide la concentración de la traza radiactiva en relación a la actividad inyectada y normalizada por el peso corporal (ver fórmula) [136]:

$$SUV = \frac{\text{Concentrac ión de actividad en el tejido}}{\text{Actividad inyectada / Peso corporal}}$$

En condiciones de ayuno, un miocardio sano utiliza como fuente de energía mayoritaria FAs, mientras que la utilización de glucosa desciende a niveles mínimos, lo que hace que las imágenes captadas por PET sean heterogéneas [135]. Por esta razón, realizamos el ensayo de PET en ayunas. Se anestesiaron las ratas con 2,5% isoflurano- $\text{O}_2$  y se inyectó a través de la vena caudal una actividad de 29,6-37 MBq de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG en suero salino, siguiendo estudios previos [137]. Para la realización de PET se utilizó el tomógrafo ARGUS PET/CT (Sedecal; España) compuesto por un escáner de doble anillo de 60 Hz. El tiempo de adquisición dinámica fue de 60 minutos. Después, transcurridos 30 minutos desde la realización de PET y para llevar a cabo el cálculo de las actividades, se extrajeron 400  $\mu\text{l}$  de sangre de la cola de los animales en un tubo *ependorf* con EDTA. Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto para obtener el plasma. Éste se congeló inmediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  para posteriores análisis de corrección de la actividad radiactiva. Con el fin de construir mapas polares de distribución de la traza en el VI se realizaron cortes transversales imaginarios con el programa ARGUS. Los datos se procesaron y se calculó el valor SUV para cada región del VI (basal, medio, apical y ápex) de cada animal (figura 12).



**Figura 12 - Distribución en mapas polares del corazón para la cuantificación de  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$  por PET.** (A) Paredes y cavidades del corazón. (B) Segmentos del corazón según cortes transversales (A-B) practicados a nivel basal, medio y apical. Los cortes basales y medios delimitan seis segmentos y el corte apical cuatro. Todos ellos junto con el ápex constituyen los 17 segmentos en que se puede dividir el corazón (Sociedades Americanas de Imagen [1]. (C) Visión de los 17 segmentos en un plano longitudinal (C-D).

#### 4. Cálculo de la homeostasis de la glucosa

A partir de una gota de sangre obtenida de una mínima sección en la cola de las ratas del modelo GK ( $n=7$ , cada grupo) tras una noche de ayuno, se midió la concentración de glucosa circulante mediante glucómetro [Glucocard G+ meter (Japón)]. Después, para la realización del test de tolerancia oral a glucosa (OGTT), se suministró a las ratas la dosis correspondiente de vehículo o sitagliptina, e inmediatamente se les administró por sonda una sobrecarga oral de glucosa (0,5 g/Kg peso corporal). Quince y sesenta minutos después se recogieron 400  $\mu\text{l}$  de sangre de la cola del animal en tubos con EDTA. Los tubos se centrifugaron 15 minutos a 2.000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ , y el plasma obtenido se utilizó para medir la concentración de glucosa e insulina por un kit de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) [kit de ELISA (Mercodia AB, Suecia)]. Para la determinación de GLP-1 se recogió sangre en tubos de cristal [Vacutainer P700 v1.0, BD, (USA)] con EDTA 0,5M e inhibidores de DPP-4 a los que se había añadido previamente 10.000 UI/ml aprotinina y 1,46 ml etanol absoluto. La concentración de GLP-1 en plasma se midió a través del método Orskov [30]. Brevemente, los tubos se agitaron por inversión durante una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron a

3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y seguidamente se liofilizaron (Labotec, USA) para resuspenderse en una solución de 0,2M glicina-0,5% BSA-500U/ml aprotinina (pH 8.8). Después, se utilizaron 100 µl para la cuantificación de GLP-1 mediante un kit de ELISA [Epitope Diagnostic Inc., (USA)]. Además se determinó el índice HOMA-IR, que estima la funcionalidad de las células β pancreáticas y la resistencia a insulina a partir de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina según la fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{Gluc. \text{ plasmática} \times Insulina}{22,5}$$

Donde la glucosa plasmática se expresa en mM y la insulina en mU/mL medidas ambas en ayunas. HOMA-IR categoriza la resistencia a insulina en unidades como sigue: <3, resistencia normal; 3-5, resistencia moderada; >5, resistencia severa [138].

## **5. Caracterización de la hipertrofia, fibrosis, esteatosis, apoptosis y oxidación en tejido cardíaco**

Las secciones de corazón almacenadas en 4% PFA se incluyeron en parafina previa deshidratación del tejido, como sigue: etanol 70%, 2 h.; etanol 96%, 90 minutos (3x); etanol 100%, 2 h. (3x); xileno, 90 minutos (2x) y parafina. Una vez enfriadas, las piezas se cortaron a 4 µm de grosor con micrótopo [Microm HM 325; Thermo Fisher Scientific (UK)] para fijarse en portaobjetos [Flex IHC; Dako (Dinamarca)]. Posteriormente se desparafinaron en estufa a 60°C durante 1 hora, inclusión en xileno durante 10 minutos e hidratación en gradiente descendente de etanol (100%, 96% y 70%, 5 minutos cada uno) y H<sub>2</sub>O.

La cuantificación de hipertrofia y fibrosis se realizó mediante la tinción de Tricrómico de Masson [Bio-Óptica, Milán, (Italia)], que permite visualizar las fibras de colágeno tipo-I en color azul-verdoso y las células musculares (cardiomiocitos) en rojo. Para el estudio de la hipertrofia se realizaron medidas morfológicas del contorno del cardiomiocito. Además, se midió la expresión del RNAm de ANP y BNP en extracto tisular y el peso relativo del corazón. En nuestro modelo ZDF se cuantificaron en conjunto todas las formas de fibrosis (intersticial, perivascular y de reemplazo) en 10 campos diferentes de cada miocardio utilizando el programa Metamorph [Molecular Devices (USA)].

Para la cuantificación de triglicéridos y depósitos de lípidos neutros en el modelo ZDF, se emplearon secciones de tejido criopreservado en OCT. Se realizaron cortes de 5 µm y se tiñeron con Oil-Red-O [ORO; Sigma-Aldrich, (USA)]. ORO es un colorante lipofílico que tiñe de forma específica en color rojo brillante TAGs y lípidos neutros [139]. Para confirmar los hallazgos obtenidos con ORO, se realizó una segunda tinción con otro colorante lipofílico: Nile-Red (Sigma). Este colorante tiñe específicamente, también en color rojo, los depósitos lipídicos intracelulares [140]. Tras la tinción con ORO y Nile-Red, los cortes se lavaron con tampón fosfato (PBS, pH 7.6) y se aplicó una tinción de contraste nuclear con hematoxilina.

La fragmentación del DNA es un proceso característico de apoptosis celular [141]. En los miocardios del modelo ZDF la apoptosis se cuantificó mediante tinción con TUNEL [Transferase dUTP Nick End Labeling; CardioTacs *In Situ* Apoptosis Detection Kit, R&D systems, Minneapolis, (USA)]. El ensayo se basa en la detección del DNA dañado por la enzima Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase). El marcaje se realizó en secciones de 5 µm de tejido incluidas en OCT y fijadas en portaobjetos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calculó el porcentaje de núcleos positivos (apoptóticos) en 200-300 células de 10 campos seleccionados al azar con el programa Metamorph.

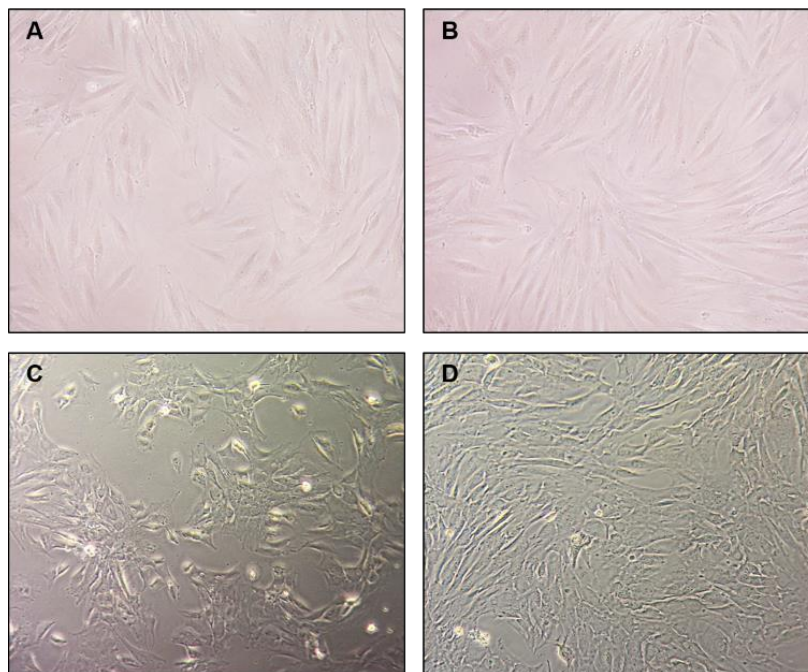
Los niveles de ROS se midieron tanto en citosol como en mitocondria. La producción de ROS citosólico se determinó mediante tinción con dihidroetidio [DHE, 5 µM; Invitrogen (USA)] en secciones de miocardio incluidas en parafina. DHE reacciona directamente con los radicales superóxido ( $O_2^-$ ) citosólicos, se oxida a etidio, y se acumula en el núcleo intercalándose en el DNA y emitiendo fluorescencia en color rojo. La intensidad de fluorescencia ( $Abs_{ex/em}$  518/605 nm) se midió en núcleos de 10 campos de 50 células cada uno utilizando el programa Metamorph. La producción de ROS mitocondrial se evaluó mediante incubación con MitoSOX (5 µM; Invitrogen), 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. MitoSOX es un fluoróforo que detecta el anión  $O_2^-$  mitocondrial, dando lugar a una fluorescencia roja ( $Abs_{ex/em}$  510/580 nm). La fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo [FACScalibur Analyzer BD, (Alemania)] y análisis de imagen con el programa Metamorph. Los núcleos de ambas inmunohistoquímicas se contrastaron con 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI).

Además de las tinciones anteriores se llevó a cabo una tinción en paralelo de cada muestra con hematoxilina/eosina (H/E) para el estudio de la estructura tisular. La hematoxilina, por ser una sustancia básica o catiónica, tiñe estructuras ácidas como el núcleo celular en tonos azules o púrpuras. La eosina, debido a su naturaleza aniónica o ácida, tiñe componentes básicos como el citoplasma en tonos de color rosa. Las preparaciones se fijaron con medio de montaje acuoso [resina, Entellan; Merck (Alemania)] (ORO, Nile-Red, TUNEL y H/E) o hidrofóbico [mowiol, Mowiol 40-88; Sigma (USA)] (DHE y MitoSOX). Las imágenes de TUNEL, ORO y Nile-Red se obtuvieron con un microscopio óptico (Leica) y con el microscopio confocal de fluorescencia (Leica) en el caso de DHE y MitoSOX.

## 6. Cultivos celulares

La línea celular de cardiomiocitos H9c2(2-1) [(ATCC, CRL-1446 (USA)] es una línea permanente de mioblastos auriculares derivados de tejido embrionario de corazón de rata BD1X que exhibe propiedades de músculo esquelético [142]. Las células H9c2 se cultivaron a 37°C y 5%  $CO_2$  en medio *Dubelcco's modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con 9% de suero bovino fetal (FBS) decomplementado, 100 IE/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina y 5 mM D-glucosa (Sigma). Los pases celulares se realizaron cada dos días levantando las células con tripsina-EDTA (Gibco, Alemania) durante 5 minutos a 37°C y subcultivando en un ratio 1:3. A la hora de realizar ensayos, las células H9c2 se contaron y se sembraron en placas. Antes de confluir (70-80%, aproximadamente  $8 \times 10^5$  células en placas P-100), las H9c2 se diferenciaron a miocitos mediante privación de FBS durante 12-16 horas (figura 13).

Además se utilizó la línea de mioblastos ventriculares C2C12 de ratón (ATCC, CRL-1772). Las C2C12 se mantuvieron con medio DMEM suplementado con 9% FBS, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y 5 mM D-glucosa. Antes de alcanzar la confluencia (70-80%), las células C2C12 se diferenciaron con medio DMEM suplementado con 2% de suero de caballo durante cuatro días (figura 13).



**Figura 13 - Líneas celulares de cardiomiocitos en cultivo.** Crecimiento de H9c2 antes y después de su diferenciación a miotubos (**A** y **B**, respectivamente). Cultivo de C2C12 antes y después de su diferenciación a miotubos (**C** y **D**, respectivamente)

Las células H9c2 y C2C12 se sometieron a condiciones de hiperglicemia y/o hiperlipemia mediante incubación con elevadas concentraciones de glucosa [D-glucosa, 25-33 mM, Sigma] y/o con un ácido graso saturado [palmitato sódico (PA), Na<sup>+</sup>-palmitato (16:0), 0,12-0,25 mM, Sigma], respectivamente. El palmitato se conjugó previamente con albúmina de suero bovino (BSA) en un ratio 3:1 (palmitato:BSA), semejando las condiciones fisiopatológicas observadas en humanos [143]. En células control se añadió la misma concentración de BSA en ausencia de palmitato. El tiempo de estimulación fue de 6 horas para estudios de expresión de RNAm y 8-12 horas para estudios de expresión proteica. Algunas células fueron pretratadas con eplerenona (1 mM-1 µM, Pfizer) una hora antes de la estimulación. La eplerenona se diluyó en 20% etanol-H<sub>2</sub>O y se esterilizó por filtración (0,22 µm; Sterile Eo, Alemania).

## **7. Determinación de la asimilación de glucosa in vitro**

Para el estudio de la asimilación de glucosa, los cardiomiocitos se incubaron en condiciones de normoglicemia (5 mM glucosa) durante 3 horas con glucosa marcada [100 µM de 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino-2-deoxiglucosa (2-NBDG; Invitrogen)] y un exceso de palmitato (0,12 mM), o insulina [10 µM; Humulina 100 UI/ml, Lilly (Alemania)], como control positivo. Algunas células fueron pretratadas con



eplerenona (1  $\mu$ M). Tras descartar el medio de cultivo y lavar las células, éstas se levantaron con tripsina-EDTA y se midió el porcentaje de células fluorescentes ( $Abs_{ex/em}$  465/540 nm) por citometría de flujo.

#### 8. Determinación de la producción de ATP celular:

Los cardiomiocitos se estimularon con elevada dosis de palmitato (0,12-0,25 mM) durante 12 horas +/- pretratamiento con eplerenona 1 hora (1 $\mu$ M). Después se lavaron con PBS y se lisaron con un buffer de liberación de ATP (100 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM ditioneol y 1% Tritón X-100, pH 7.8). Diez  $\mu$ l de este lisado se utilizaron para determinar la concentración proteica y otros diez para la cuantificación de ATP empleando un kit específico (ATP Determination Kit, Invitrogen), conforme a las instrucciones del fabricante. La producción de ATP se calculó en  $\mu$ g ATP/ $\mu$ g proteína.

#### 9. Cuantificación de la apoptosis/supervivencia, acumulación lipídica y oxidación celular

En el ciclo celular las células quiescentes (fase  $G_0$ ) entran en fase  $G_1$  y comienzan la síntesis y activación de proteínas. Al final de esta fase las células alcanzan un punto de restricción que, tras sobrepasarlo, entran en fase S o de replicación del DNA. Finalmente, de aquí pasan a la fase  $G_2$  donde se produce su división [144]. Las células apoptóticas se caracterizan por una hipodiploidía en la fase sub  $G_0/G_1$  del ciclo celular, que puede ser detectada por citometría de flujo. Tras la estimulación, los cardiomiocitos se levantaron con tripsina-EDTA 0,5%, se permeabilizaron con PBS/0,05% NP-40 y 10  $\mu$ g/ml RNasa-A durante 3 horas a 4°C, y se incubaron con yoduro de propidio para marcar el DNA celular y contarlas por citometría de flujo ( $Abs_{ex/em}$  536/617 nm). Además se analizó la tasa de supervivencia celular mediante el ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Este compuesto es metabolizado por las enzimas NAD(P)H oxido-reductasas de las células viables dando lugar a formazán que, al ser insoluble en el medio de cultivo, genera un precipitado de color púrpura que se detecta por colorimetría. El MTT se añadió a las células depleccionadas (0,5 mg/ml) durante 3 horas a 37°C. Después se retiró el medio y se diluyó el formazán precipitado en cada pocillo con isopropanol anhidro. A continuación se midió la absorbancia a 540 nm.

Para la cuantificación de esteatosis celular, los cardiomiocitos estimulados, se fijaron con 4% PFA y tiñeron con ORO del mismo modo que los corazones del modelo ZDF. La acumulación lipídica se cuantificó utilizando el programa *Metamorph*, contando diez campos de 50 células de, al menos, 3 experimentos independientes.

Para examinar la producción de ROS mitocondrial, se utilizó la tinción con MitoSOX. Los cardiomiocitos se fijaron e incubaron con MitoSOX, tal como se realizó en los corazones. Se contaron 10 campos de 50 células de, al menos, 3 experimentos independientes. Además, la producción de  $O_2^{\cdot -}$  mitocondrial se evaluó por citometría de flujo. Las células se cultivaron en DMEM (sin rojo fenol) suplementado con 10% FBS hasta subconfluencia. Tras depleccionar las células, éstas se estimularon con palmitato (0,12 mM) e incubaron con MitoSOX, el cual se detectó por citometría de flujo ( $Abs_{ex/em}$  510/580 nm) a diferentes intervalos de tiempo (10-60 minutos). Como control positivo de la oxidación mitocondrial se utilizó 1 mM de  $H_2O_2$  (Panreac Química, España).

## **10. Cuantificación de la acumulación lipídica tisular y celular**

Extractos congelados en N<sub>2</sub> líquido de VI u 8x10<sup>5</sup> cardiomiocitos estimulados, se disolvieron en 25 µl etanol/mg ó 100 µl etanol, respectivamente. A las muestras se añadieron bolitas de cristal [2 mm, Qiagen (Hilden, Alemania)] y se agitó intensamente [TissueLyser LT (Qiagen)] durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 15.400 g y 15°C durante 20 minutos, y 80 µl de los sobrenadantes (lípidos celulares) se transfirieron a viales para analizar por cromatografía de masas líquida [Ultra High Liquid Chromatography-Mass (UHPLC-MS)]. Estas mediciones se llevaron a cabo en la Fundación Universitaria San Pablo CEU por el Dr. J. Rupérez utilizando el espectrómetro Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), equipado con un sistema LC serie 1.290 y un detector 6.550 iFunnel QTOF MS. Para ello, se inyectó 1 µL de cada muestra en una columna Zorbax Eclipse Plus C8, 2.1, 150 mm de 1,8 µm (Agilent Technologies) a 80°C. Los componentes fueron eluidos en un gradiente lineal (0.6 mL/min) con formiato amónico 10 mM (pH 6.5) y 50%-100% de metanol. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa MassHunter Qualitative Analysis B.05.00. Se eliminaron los iones no relacionados por la herramienta Molecular Feature Extraction (MFE). El pretratamiento de datos, incluyendo el alineamiento y filtrado, se realizó con el programa MassProfiler Professional (B.12.01, Agilent Technologies), resultando una matriz principal de componentes con las muestras separadas por sus tiempos de retención característicos y su masa neutra, y la abundancia de cada componente para cada una de ellas. Una vez depurada la lista de moléculas, se exportó a tres bases de datos públicas (METLIN-<http://metlin.scripps.edu/>; LipidMaps-<http://www.lipidmaps.org/>; y KEGG – <http://www.genome.jp/kegg/>), y se identificaron las características de cada lípido por su masa exacta (error inferior a 5 ppm).

## **11. Análisis de proteínas**

Cincuenta mg de VI o extractos celulares procedentes de 8x10<sup>5</sup> cardiomiocitos cultivados se homogeneizaron con bolitas de acero de 0,9 mm de diámetro siguiendo las instrucciones del fabricante (SSB14B, Next Advance, Inc. USA) con el homogeneizador Bullet Blender (Cultek) y en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2% SDS +1/250 cocktail de inhibidores de proteasas mamíferas) frío. Para la obtención y separación de proteínas citosólicas y de membrana se homogeneizaron los fragmentos de tejido o los extractos proteicos en buffer HB (3 mM imidazol y 250 mM sacarosa a pH 7.2). El homogeneizado se pasó 3 veces por una aguja de 22g de diámetro y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 65.000 rpm durante 15 minutos en una ultracentrífuga (Beckman). El pellet (núcleos celulares) se lavó 3 veces más y se congeló. Una vez ultracentrifugados, el sobrenadante (citosol celular) se retiró y congeló. El nuevo pellet (membranas celulares) se lavó 3 veces más y después se congeló. Para la localización de Glut4, Glut1 y FAT/CD36) en los modelos de ratas y en cardiomiocitos, se realizó una separación diferencial en gradiente de sacarosa, obteniendo extractos proteicos endosomales y de membrana plasmática (sarcolema). Para ello se homogeneizaron los extractos tisulares o celulares en buffer de lisis (1mM EDTA, 250 mM sacarosa y 10 mM Tris a pH 7.5). El homogeneizado se pasó 8 veces consecutivas a través de una aguja de 22g de diámetro y a continuación se centrifugó a 760g durante 5 minutos a 4°C. Una vez centrifugados, los sobrenadantes se recogieron en tubos de ultracentrífuga y se centrifugaron a 31.000g durante 1h a 4°C para la obtención del pellet de proteínas del sarcolema. A continuación se recogieron los sobrenadantes y

se centrifugaron a 190.000g durante 1h a 4°C para obtener las proteínas endosomales. Posteriormente en todos los casos se determinó la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinonínico (BCA, Pierce).

### 11.1. *Western Blot y ELISA*

Aproximadamente 40 µg de proteínas de extractos tisulares o celulares se separaron en geles de acrilamida-bisacrilamida 29:1 (Protogel) al 10-12% a voltaje constante de 120V, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (iBlot, Invitrogen), bloqueadas con 5% de leche desnatada (Sveltesse, Nestlé, Barcelona) en buffer salino Tris-borato con 1% Tween 20 (TBST) e incubadas con anticuerpos primarios específicos (tabla 1). La gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de carga. Las membranas se lavaron con TBST cada 5 minutos (x5) y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en TBST con 5% leche desnatada a concentración 1:5.000. Todos los anticuerpos secundarios estaban conjugados con peroxidasa (GE-Healthcare, España). Para la generación de quimioluminiscencia se utilizó el sustrato HRP *Luminata Crescendo* (Millipore). Las membranas se expusieron en el sistema digital de imagen ImageQuant LAS 4.000 (GE Healthcare). En cada western blot se muestra un gel representativo de todas las ratas, o, de al menos tres experimentos independientes de cultivos celulares, junto con su semi-cuantificación (n-veces vs. GAPDH).

La insulina y aldosterona en plasma se detectaron mediante kits de ELISA específicos (Mercodia, Suecia). En el caso de los cultivos *in vitro*, se determinó el nivel de glucocorticoides aislando los medios de cultivo y centrifugándolos después a 1.200 rpm durante 10 minutos con kits de ELISA dirigidos (BlueGene; antibodies-online.com) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anticuerpos Primarios				
Anti-	Origen	Dilución	Huésped	Casa comercial
<b>ACSL-1</b>	Humano	1:500	Ratón	Sigma
<b>Caspasa-3</b>	Humano	1:500	Conejo	Cell-Signaling
<b>DGAT-1</b>	Humano	1:1.000	Cabra	Sigma
<b>FABP3</b>	Humano	1:250	Ratón	Abcam
<b>FAT/CD36</b>	Humano	1:1.000	Conejo	Sigma
<b>GAPDH</b>	Humano	1:5.000	Ratón	Millipore
<b>Glut1</b>	Humano	1:5.000	Conejo	Santa Cruz B.
<b>Glut4</b>	Humano	1:250	Ratón	Sigma
<b>GPAT-1</b>	Humano	1:1.000	Conejo	Sigma
<b>IRS-1</b>	Humano	1:500	Conejo	Sigma
<b>NRF1</b>	Humano	1:500	Conejo	Sigma
<b>PDK4</b>	Humano	1:1.000	Conejo	Sigma
<b>PGC-1α</b>	Humano	1:500	Conejo	Sigma
<b>PPARα</b>	Humano	1:500	Conejo	Sigma
<b>Tfam</b>	Humano	1:500	Conejo	Sigma

**Tabla 1 - Anticuerpos utilizados para la detección de diferentes proteínas cardíacas en tejido y células por Western Blot.**



## 12. Determinación de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa

A partir de 50 mg de VI homogeneizados (Bullet Blender) u  $8 \times 10^5$  cardiomiocitos estimulados, se extrajo el RNA total con TRIzol® (Invitrogen). Se añadieron 500 µL/placa o extracto tisular de TRIzol® más 100 µL de cloroformo (Fisher) y se agitaron en tubos eppendorf durante 15 segundos con vórtex. Tras reposar 5 minutos a temperatura ambiente se centrifugaron 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Seguidamente se recogió la fase superior y se añadieron 250 µL de isopropanol (Fisher). Los tubos se congelaron a -20°C durante 30 minutos para la precipitación del RNA. Después, los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y 4°C para obtener un pellet que se lavó con etanol-H<sub>2</sub>O 75% (Merck), se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 15 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Promega, España). Para medir la concentración y calidad (ratios RNA/DNA y RNA/Proteína) del RNA obtenido se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo). Dos µg de RNA total se retrotranscribieron a cDNA mediante un kit de retrotranscripción [High Capacity (Applied Biosystems)]. El cDNA se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (QPCR) multiplex con diferentes sondas para los genes a estudiar (tabla 2).

Gen	Especie	Fluoróforo	Referencia de la sonda
<b>ANP</b>	Rata	FAM	Rn00561661_m1
<b>BNP</b>	Rata	FAM	Rn00580641_m1
<b>Colágeno tipo-IV</b>	Rata	FAM	Rn01401018_m1
<b>Fibronectina</b>	Rata	FAM	Rn00569575_m1
<b>FAT/CD36</b>	Rata	FAM	Rn00580728_m1
<b>FABP3</b>	Rata	FAM	Rn00577366_m1
<b>ACADI</b>	Rata	FAM	Rn00563121_m1
<b>ACADm</b>	Rata	FAM	Rn00566390_m1
<b>Cpt-1b</b>	Rata	FAM	Rn00682395_m1
<b>18S</b>	Eucariota	VIC	4310893E

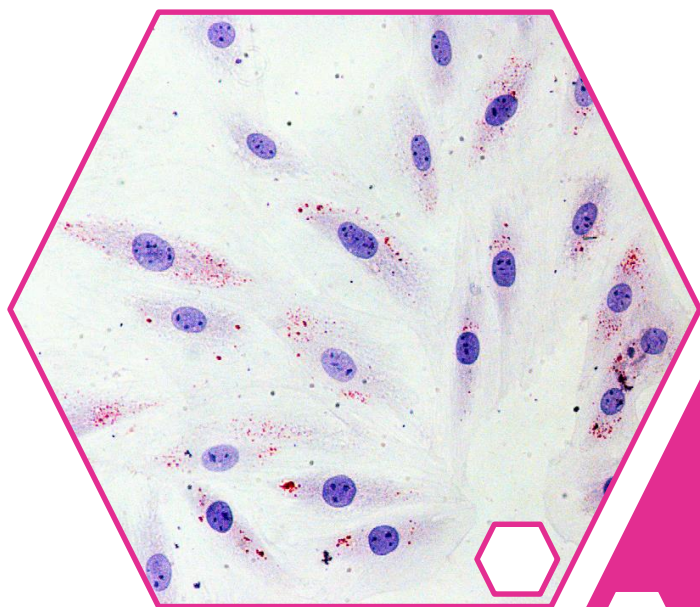
**Tabla 2 - Sondas utilizadas para el análisis génico por QPCR.**

La mezcla para la QPCR se preparó como sigue: 33 ng de cDNA, 0,25 µl de sonda de expresión marcada con fluoróforo FAM más 0,125 µl de sonda del gen de control interno de expresión de la subunidad 18S ribosómica eucariota marcado con fluoróforo (VIC), 5 µl de buffer premix (polimerasa y sales) y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos cada uno a 95°C y 1 minuto a 60°C. Todas las muestras se cargaron en placa de 96 pocillos por triplicado para obtener un ciclo umbral (Ct) medio. Si la desviación para cada triplicado superaba 0,3 ciclos, su Ct se descartó para el análisis. La expresión relativa de cada gen se calculó siguiendo el modelo matemático  $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$  y en relación a la expresión de 18S.

**13. Análisis estadístico:**

Los resultados de expresión proteica y RNAm se muestran como incrementos de n-veces con respecto al control. Todos los datos se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar, y fueron analizados mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney (Programa R, USA). Valores cuya  $p < 0,05$  (dos colas), fueron considerados significativos.








*RESULTADOS I*



En esta primera parte de resultados estudiamos el efecto de la eplerenona en el desarrollo de la patología cardíaca inducida por DM2/obesidad. El bloqueo de MR por eplerenona ha sido probado satisfactoriamente en la reducción del riesgo cardiovascular en modelos murinos de hipertensión, daño renal crónico e isquemia/reperfusión, y en pacientes con insuficiencia cardíaca e infarto agudo de miocardio [98, 145-147]. Sin embargo, no se conoce el efecto del bloqueo de MR en la MCD, concretamente en los procesos asociados de esteatosis y apoptosis cardíaca.

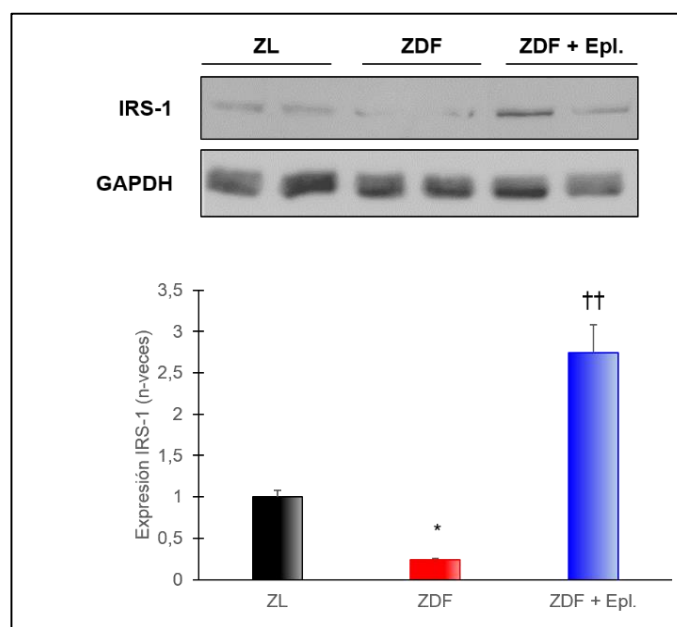
### 1. La administración de eplerenona redujo la hiperlipemia y la resistencia a insulina en ratas DM2/obesas

Las ratas ZDF alimentadas con dieta hiperlipémica desarrollaron obesidad y DM2, conforme a lo descrito previamente [129]. Asimismo presentaron valores significativamente elevados de glucosa, lípidos (Ch, TAG y FFAs) y aldosterona en plasma en comparación con las ratas ZL (figura 13). Sin embargo, tras 16 semanas de tratamiento con eplerenona a una dosis de 25 mg/kg peso corporal/día, los valores de Ch, TAG y FFAs sufrieron un descenso significativo en paralelo a un aumento de aldosterona, mientras que los niveles de glucosa no se vieron alterados (figura 14).

	ZL	ZDF	ZDF + Epl.
			
<b>Peso (g)</b>	431.9±26.73	341.14±38.71**	338.25±70.26
<b>HW/BW</b>	3.73±0.49	6.39±0.51	5.48±0.11
<b>HW/FL</b>	0.41±0.03	0.55±0.06*	0.47±0.01†
<b>Aldosterona (pg/ml)</b>	180±57.19	430±192.63*	816±154.49††
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	194.55±38.2	666.66±102.61**	697.51±89.8
<b>Insulina (ng/ml)</b>	1.08±0.11	1.83±0.24*	2.00±0.28
<b>Ch (mg/dl)</b>	61.11±8.35	187.16±14.13**	143.4±12.26††
<b>TAG (mg/dl)</b>	39.66±8.36	397.66±166.87**	111.7±33.21††
<b>FFA (mM)</b>	1.61±1.15	5.17±1.19**	0.73±0.3††
<b>HDL (mg/dl)</b>	19.77±2.33	76.5±10.36**	73.2±12.26
<b>Ch no HDL (mg/dl)</b>	41.33±6.53	112.33±14.05**	111.75±32.8

**Figura 14 - La eplerenona redujo la hiperlipemia en ratas obesas/DM2.** Tras 16 semanas de tratamiento, la eplerenona disminuyó el Ch, TAG y FFAs circulantes así como el peso relativo del corazón en ratas ZDF. Se muestran imágenes representativas de cada grupo de ratas (n=10) y detalle del corazón. Ch, colesterol; TAG, triacilglicéridos; FFA, ácidos grasos libres; HDL, lipoproteínas de alta densidad; HW, peso del corazón; FL, longitud del fémur; \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs. ZL. †p<0,05 y ††p<0,01 vs. ZDF.

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la presión sistólica entre los grupos ( $135,0 \pm 8,1$ ;  $139,8 \pm 15,2$  y  $145,2 \pm 5,3$  mm Hg para ZL, ZDF y ZDF + Epl., respectivamente), y los parámetros de daño severo renal (urea, creatinina y albúmina) y hepático (niveles enzimáticos de aspartil y alanina aminotransferasas) permanecieron inalterados en todos los grupos (no mostrado). A partir de las muestras de orina se analizaron los niveles de proteinuria que resultaron significativamente elevados en el grupo ZDF y revertidos por eplerenona ( $8,4 \pm 3,5$ ;  $134 \pm 43$  y  $19,3 \pm 13,3$   $\mu\text{g/día}$  para ZL, ZDF y ZDF + Epl., respectivamente,  $p < 0,01$ ). Puesto que los antagonistas de MR pueden inducir hiperpotasemia [146], se monitorizó la concentración de potasio en el plasma de los animales de forma periódica. A la dosis y tiempo de eplerenona empleados, las concentraciones de potasio se mantuvieron en los rangos normales ( $4,4 \pm 0,58$  mEq/l). Además, las ratas ZDF exhibieron niveles elevados de insulina en sangre (figura 14) y mediante *Western Blot* se observó que también presentaban una expresión reducida de un intermediario clave en la señalización de insulina, IRS-1 (figura 15), como ocurre en condiciones de resistencia a insulina y DM2 [148]. El tratamiento con eplerenona no mejoró la hiperinsulinemia pero recuperó los niveles de IRS-1 tisulares en ratas ZDF (figuras 14 y 15, respectivamente).

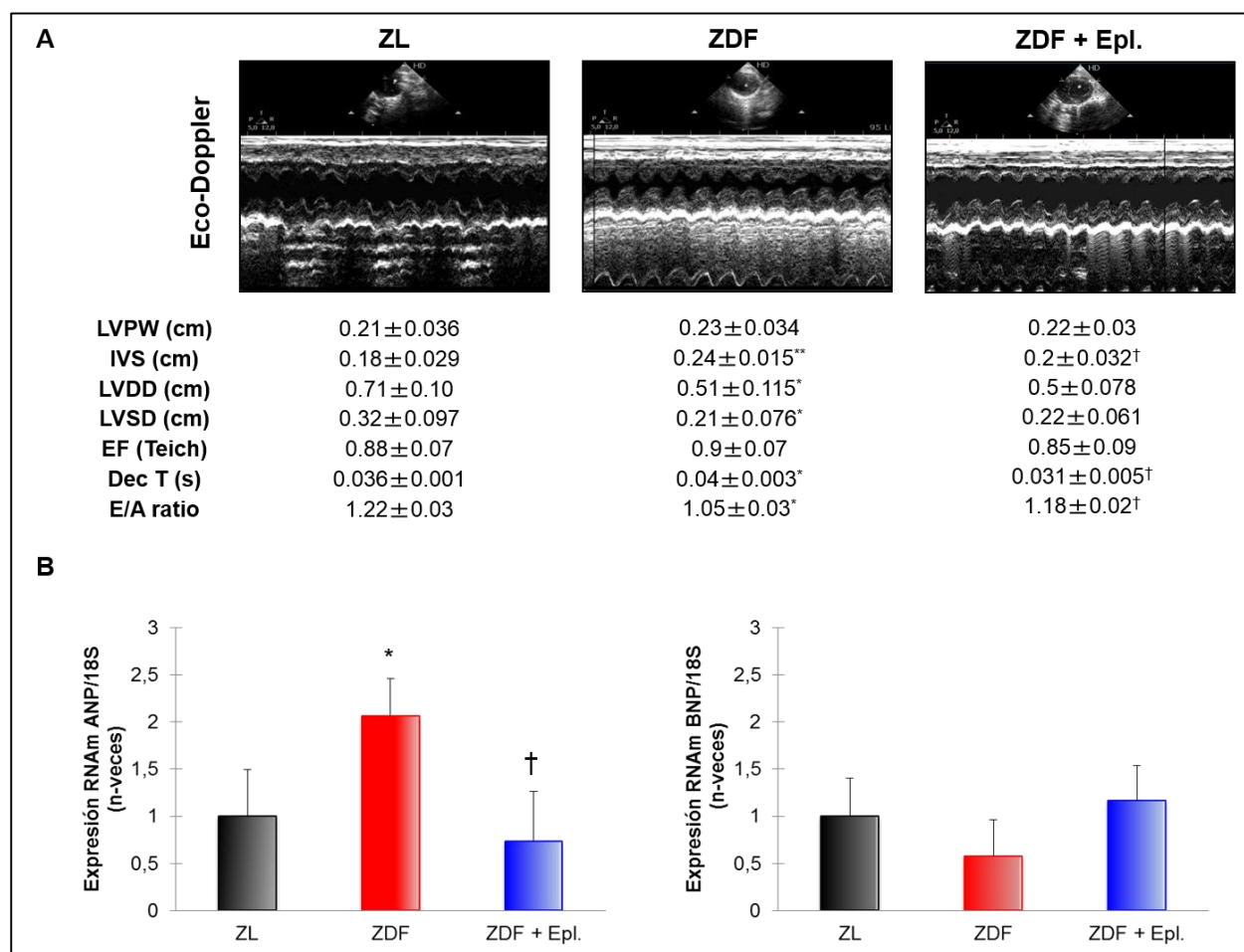


**Figura 15 - La eplerenona podría mejorar la respuesta a insulina en ratas ZDF.** Expresión de IRS-1 en el miocardio de las ratas del modelo. \* $p < 0,05$  vs. ZL. †† $p < 0,01$  vs. ZDF.

## 2. La eplerenona atenuó la hipertrofia cardíaca y la disfunción diastólica en ratas ZDF

Las ratas ZDF mostraron un incremento del ratio peso del corazón/longitud del fémur (HW/FL; figura 14). Además, por ecocardiografía (figura 16 A) se observó que los corazones ZDF presentaban un aumento del grosor del septo interventricular (IVS) y una reducción de los diámetros del VI en sístole (LVSD) y diástole (LVDD). Además, un marcador pro-hipertrofico, el péptido natriurético atrial (ANP), resultó incrementado en el grupo ZDF. Sin embargo, la expresión del péptido natriurético cerebral (BNP) no se vio significativamente modificada (figura 16 B).

Además, las ratas ZDF presentaron una prolongación del tiempo de deceleración (Dec. T) y un descenso del ratio de las ondas E/A, sugiriendo una disfunción diastólica. Sin embargo, la fracción de eyección (FE), un parámetro que mide la función sistólica, no se vio alterada. El tratamiento con eplerenona atenuó HW/FL, IVS, expresión de ANP, Dec. T., y ratio E/A, indicando una mejora de la hipertrofia cardíaca y disfunción diastólica en los animales (figuras 14 y 16).



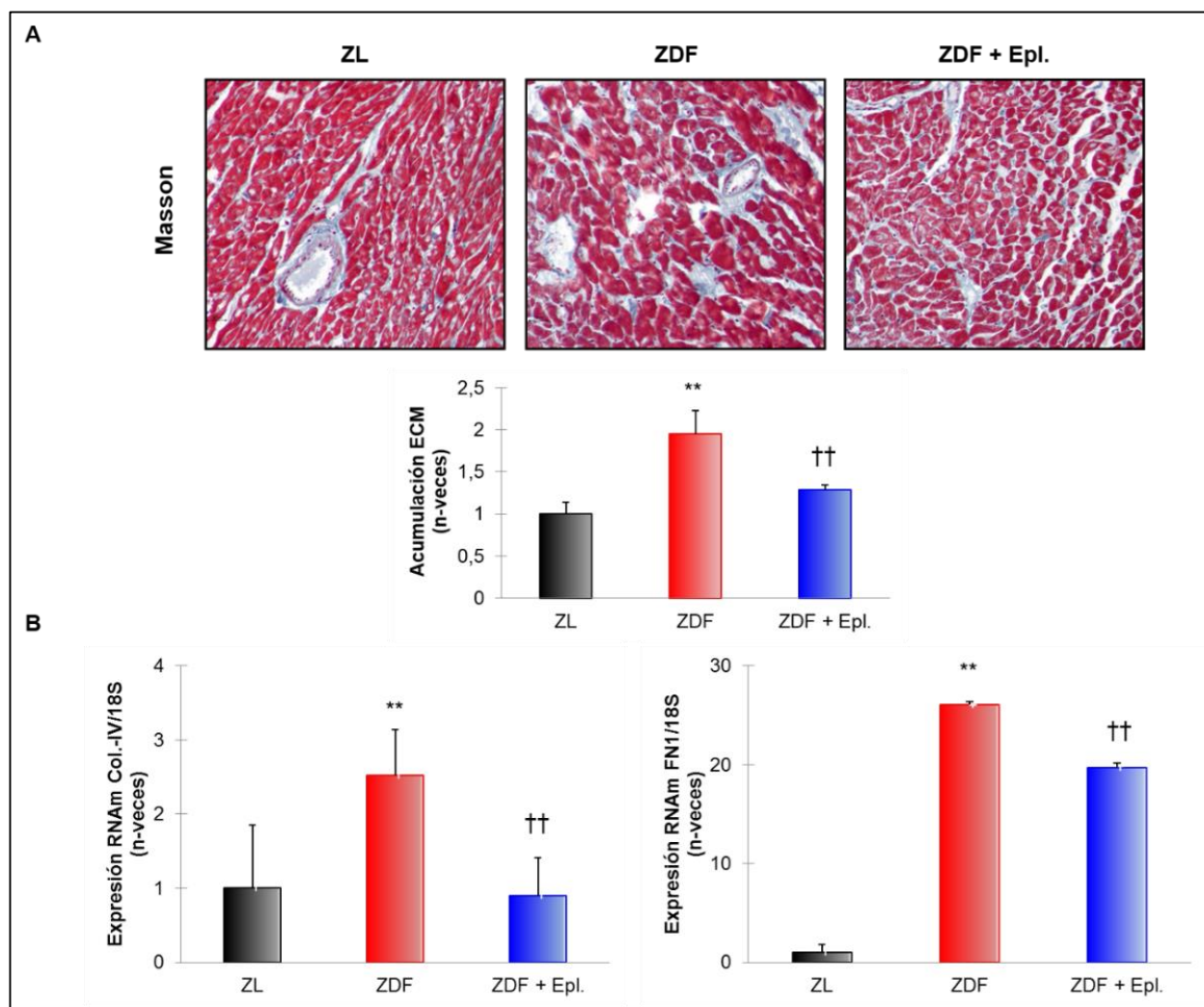
**Figura 16 - La eplerenona mejoró la función y estructura cardíaca en ZDF.** (A) Mediante Eco-Doppler, parámetros estructurales y funcionales de los corazones de ratas ZL, ZDF y ZDF tratadas con eplerenona. Se muestran imágenes representativas de cada grupo. (B) Expresión cardíaca de ANP y BNP. LVPW, espesor de la pared posterior del VI; IVS, septo interventricular; LVDD y LVDS, diámetros del VI diastólico y sistólico, respectivamente; EF, fracción de eyección y Dec T., tiempo de desaceleración. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. ZL. † $p < 0,05$  vs. ZDF.

### 3. La eplerenona redujo la fibrosis y apoptosis en el miocardio de ratas ZDF

Mediante tinción con tricrómico de Masson observamos que el VI de ratas ZL mostraba una estructura normal con un espacio intersticial regular. Por el contrario, las ratas ZDF presentaban una arquitectura anómala y desorganizada, con aumento del tamaño celular y espacio intersticial (figura 17 A). Sin embargo, el tratamiento con eplerenona mejoró la organización celular y aminoró el tamaño celular además de atenuar la deposición de matriz extracelular (MEC) intersticial y, principalmente, perivascular. En este sentido, la expresión de factores pro-fibróticos como colágeno tipo-IV o FN-1 también resultó

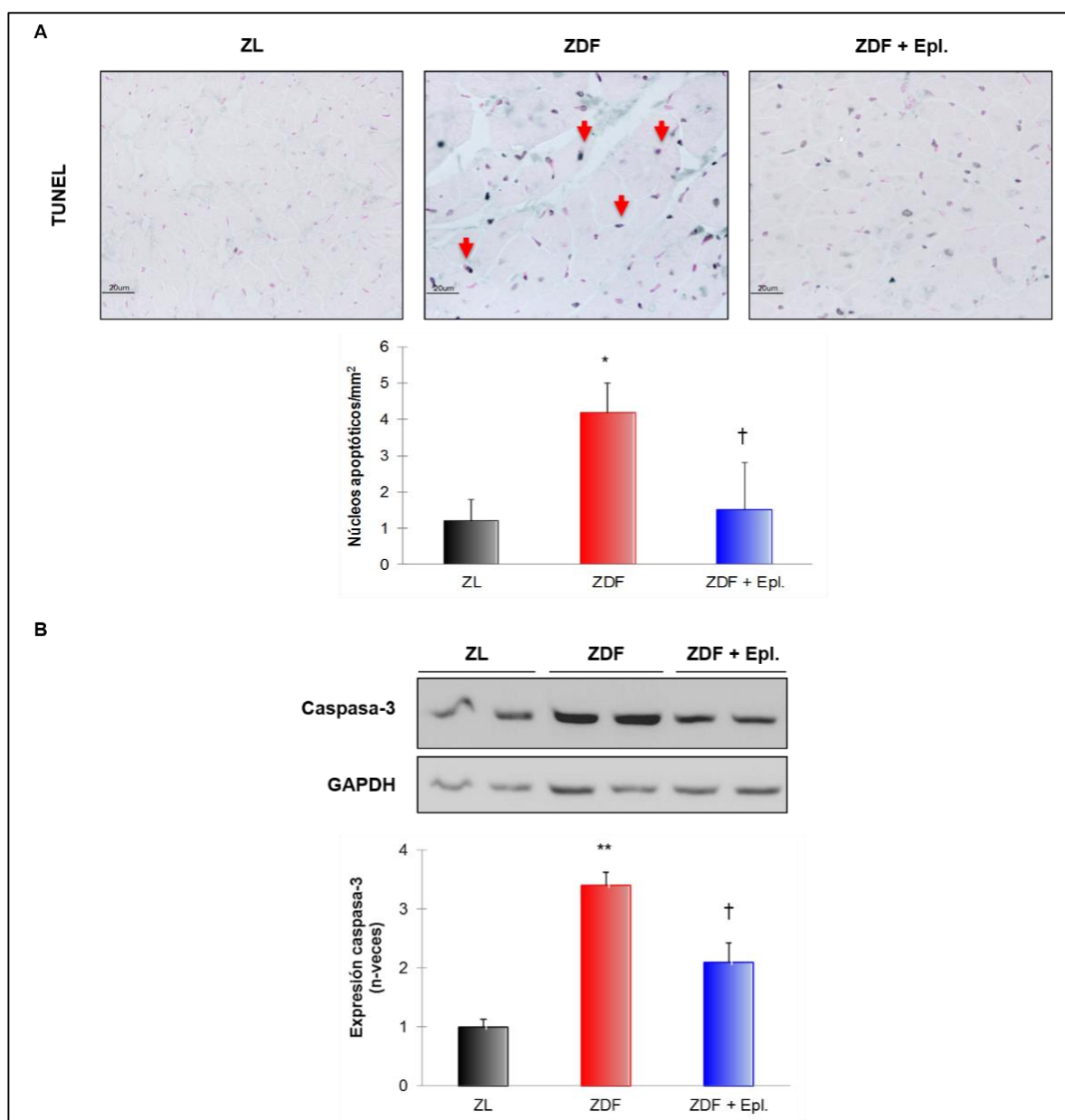


reducida por eplerenona (figura 17 B), confirmando así resultados previos en MCD experimental y humana [106, 149].



**Figura 17 - La eplerenona atenuó la hipertrofia y fibrosis celular en el miocardio de ratas ZDF.** (A) Mediante tinción de Masson se observó abundante deposición de MEC (marcaje en azul verdoso) y aumento del tamaño celular en el miocardio ZDF que fue mitigado por el tratamiento con eplerenona. (B) Expresión del RNAm de colágeno tipo-IV (Col.-IV) y fibronectina-1 (FN-1) en las ratas. \*\* $p < 0,01$  vs. ZL. †† $p < 0,01$  vs. ZDF.

Puesto que la hipertrofia (figuras 14, 16 y 17) y fibrosis (figura 17) podrían contribuir al remodelado cardíaco inducido por una pérdida de celularidad [36], investigamos la respuesta apoptótica del corazón ZDF y, como novedad, los efectos producidos por la eplerenona al respecto. De modo interesante, mediante TUNEL (figura 18 A) se observó un incremento de núcleos apoptóticos en el miocardio ZDF que fue mitigado por eplerenona. Además, el miocardio ZDF presentó una activación de caspasa-3 pro-apoptótica que fue atenuada por el tratamiento (figura 18 B). Así, la eplerenona podría no sólo mejorar la hipertrofia y fibrosis cardíaca asociada a MCD, sino además, el proceso de apoptosis celular.

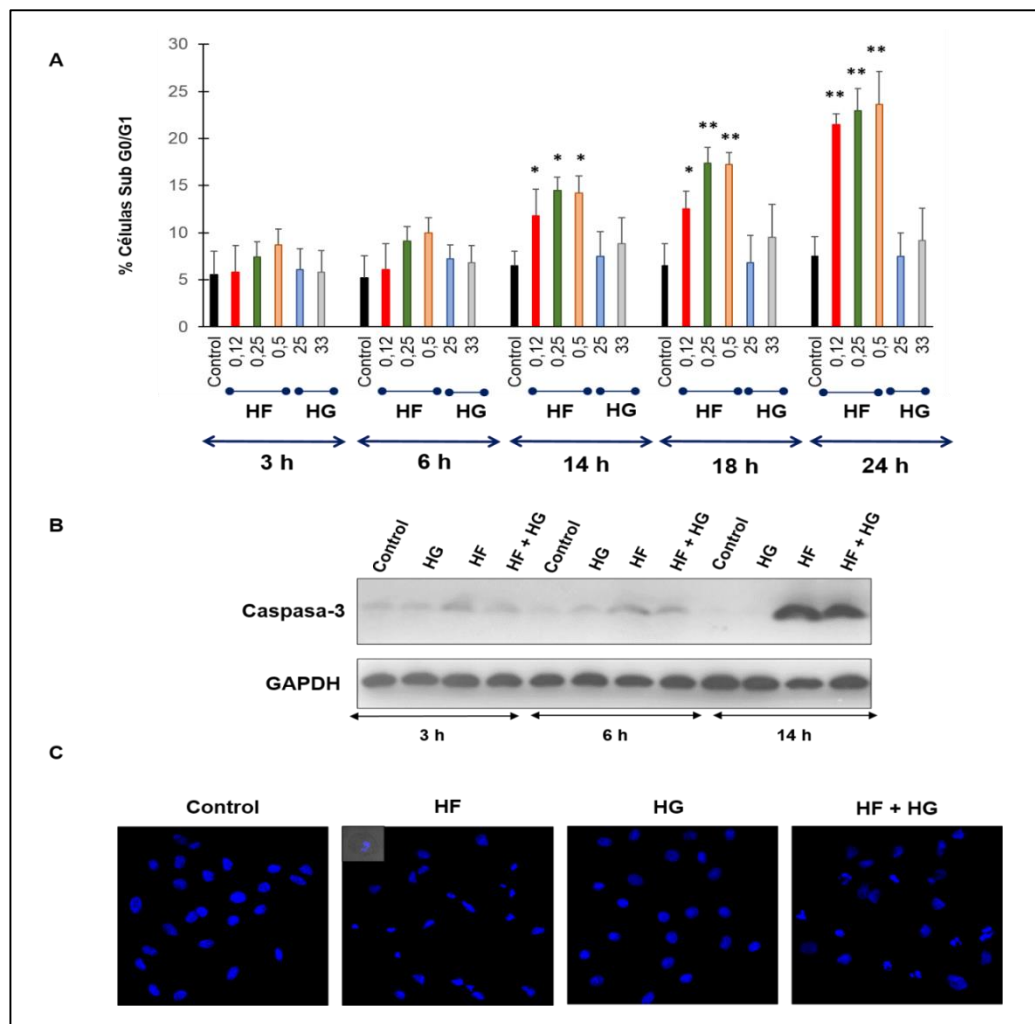


**Figura 18 - La eplerenona atenuó la apoptosis cardíaca en ratas ZDF. (A)** Detección de núcleos apoptóticos (flechas rojas) mediante TUNEL. **(B)** Activación de caspasa-3 (isoforma activa~17 kDa) en ratas ZL, ZDF y ZDF tratadas con eplerenona. \* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$  vs. ZL. † $p<0,05$  vs. ZDF.

#### 4. La eplerenona disminuyó la apoptosis en cardiomiocitos expuestos a una elevada dosis de ácido graso.

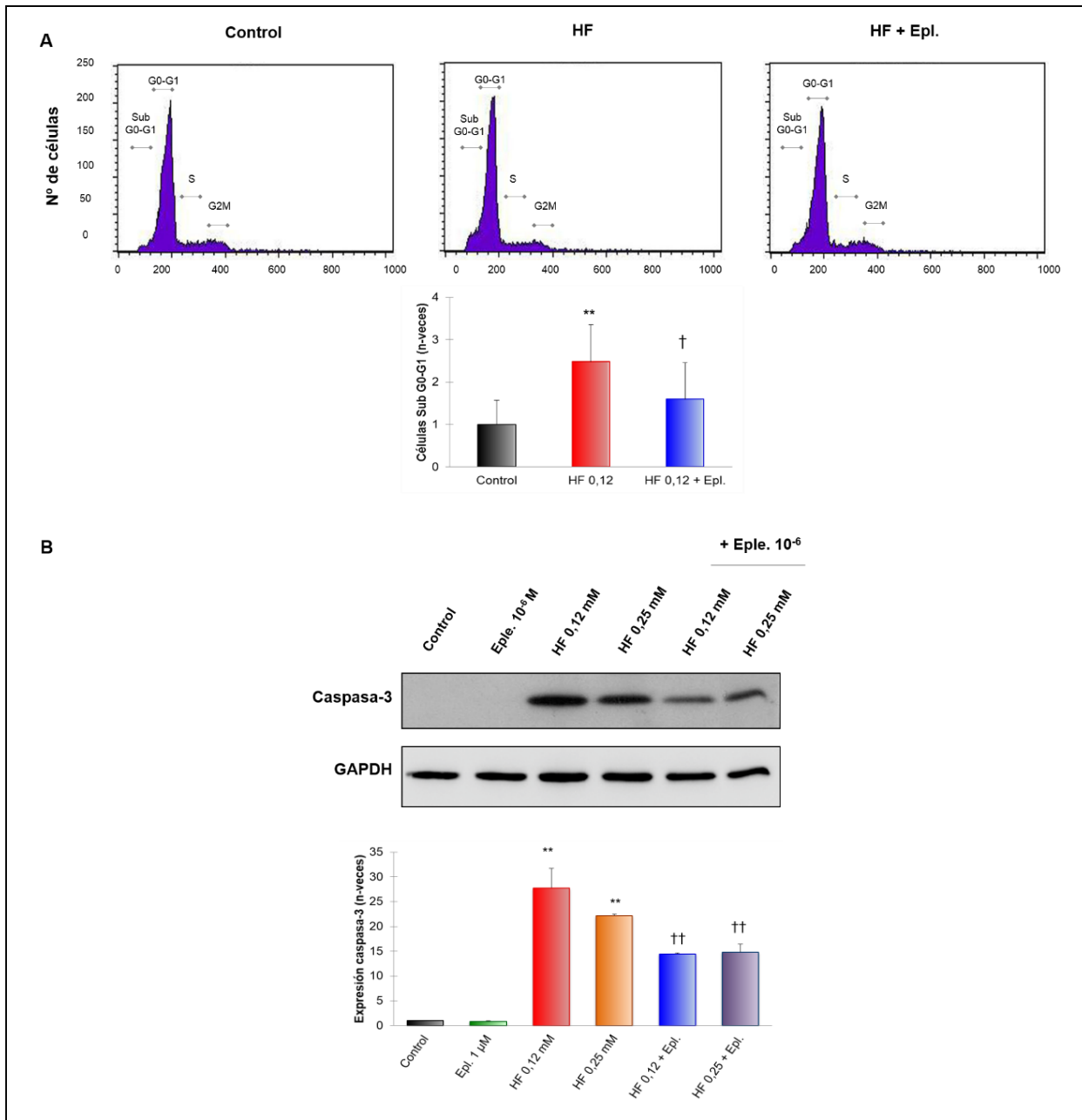
Con el fin de conocer si los efectos anti-apoptóticos de la eplerenona observados en el miocardio pudieran ser directos o derivados de la disminución de la hiperlipemia, se evaluó la respuesta apoptótica en cultivos de cardiomiocitos de la línea celular H9c2 pretratados con eplerenona y estimulados con una elevada concentración de palmitato (HF). En primer lugar, mediante citometría de flujo observamos que HF a una concentración de 0,12 mM incrementaba de forma significativa el número de cardiomiocitos apoptóticos a partir de 14 horas de estimulación (figura 19 A). Similares resultados fueron obtenidos con la

citoquina pro-apoptótica IFN $\gamma$  (no mostrado). Además, se observó activación de caspasa-3 (figura 19 B), picnosis nuclear y pérdida de celularidad (figura 19 C). La incubación de H9c2 con una elevada dosis de glucosa (HG, 25-33 mM) no produjo apoptosis ni activación de caspasa-3. La co-incubación con HF y HG no modificó los valores obtenidos sólo con HF.



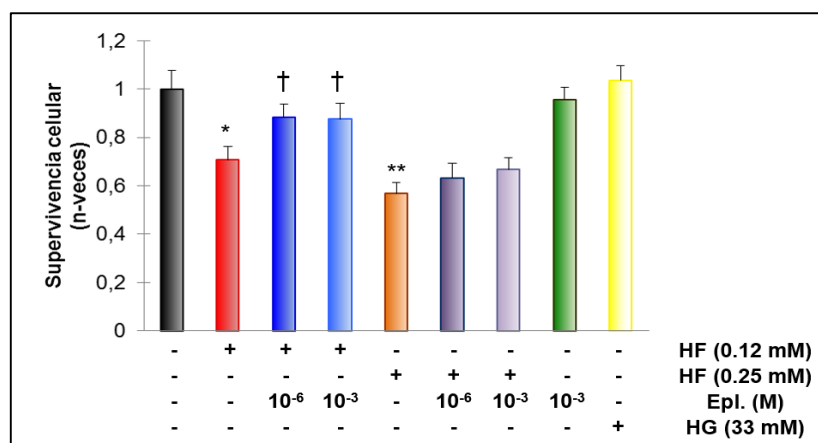
**Figura 19 - HF indujo apoptosis en cardiomiocitos.** (A) Por citometría de flujo, porcentaje núcleos apoptóticos (fase sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> celular) en cardiomiocitos expuestos a HF (0,12-0,5 mM) y/o  $\mu$  (25-33 mM) tras 3-24 horas de exposición. (B) Activación de caspasa-3. (C) Detección de picnosis nuclear tras 14 horas de estimulación. Detalle de célula apoptótica en HF. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  Control.

En cultivos de H9c2, HF además estimuló la liberación de aldosterona al medio extracelular a partir de 6 horas de incubación y una dosis de 0,12 mM (no mostrado). De interés, el pretratamiento con eplerenona  $10^{-6}$ M *in vitro* produjo un descenso de la muerte celular por apoptosis (figura 20 A) y de la expresión de caspasa-3 inducida por HF (figura 20 B).



**Figura 20 - La eplerenona redujo la apoptosis en cardiomiocitos expuestos a HF. (A) Detección de cardiomiocitos en apoptosis (fase sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>). (B) Activación de caspasa-3 en células incubadas con HF y HF + Eplerenona. \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. HF.**

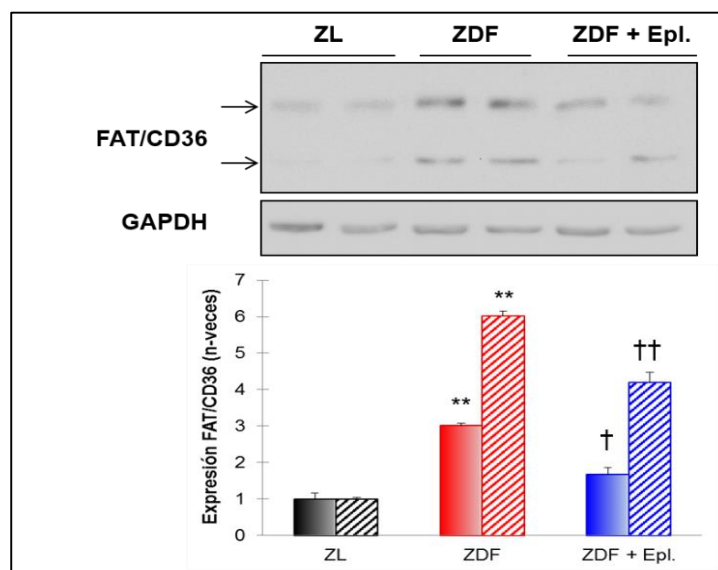
Estos datos fueron corroborados por ensayos de supervivencia celular con metil tiazol tetrazolio (MTT). La incubación de H9c2 con HF disminuyó de forma significativa la supervivencia celular a las mismas dosis (0,12 y 0,25 mM), mientras que el pretratamiento con eplerenona revirtió este efecto (sólo para la dosis de 0,12 mM de HF) (figura 21). HF y eplerenona por sí solas no modificaron estas tasas.



**Figura 21 - La eplerenona incrementó la viabilidad celular en cardiomiocitos expuestos a HF.** Ensayo MTT de viabilidad celular en H9c2 estimuladas con HF±eplerenona o HG. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  vs. HF.

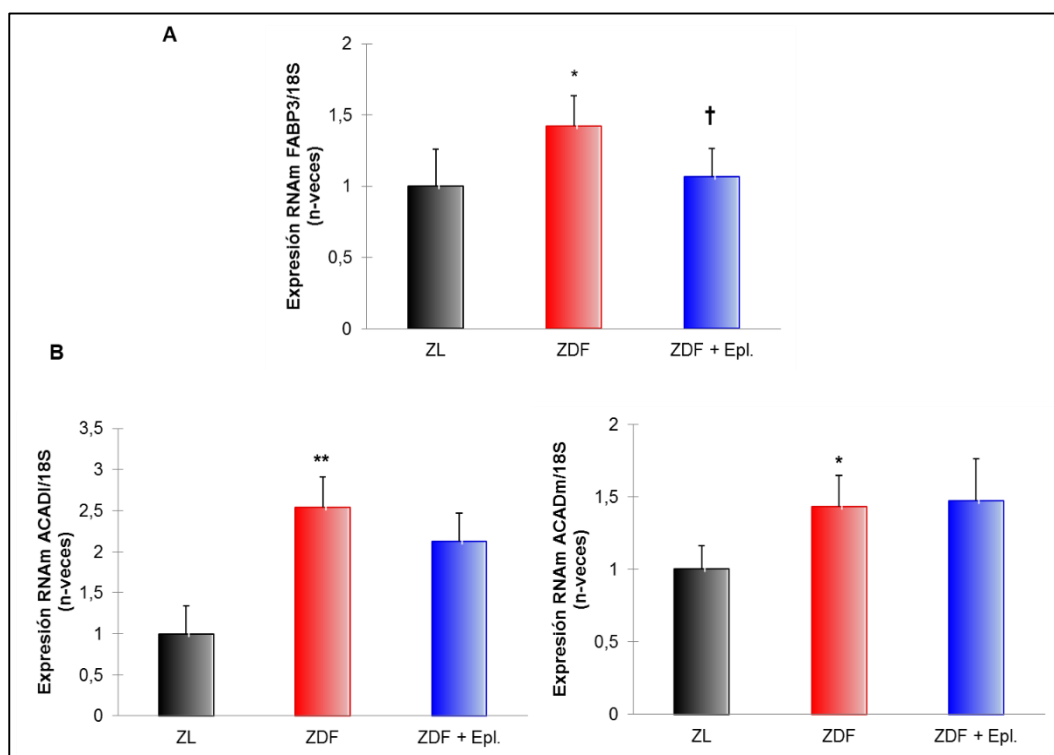
## 5. La eplerenona redujo la esteatosis cardiaca en ratas ZDF.

La apoptosis presente en los corazones de las ratas ZDF y en cardiomiocitos estimulados con HF podría ser consecuencia del exceso de asimilación y acumulación de FAs [150]. La entrada de FAs en el cardiomiocito ocurre de forma mayoritaria a través de los receptores FAT/CD36, que se movilizan desde las vesículas endosomales al sarcolema celular [151]. En nuestro modelo, la expresión y traslocación de FAT/CD36, tanto la isoforma no-glicosilada (endosomal~53 kDa) como la glicosilada/fosforilada (sarcolema~90 kDa) estaban incrementadas en los corazones ZDF (figura 22). Sin embargo, el tratamiento con eplerenona restauró ambos niveles.



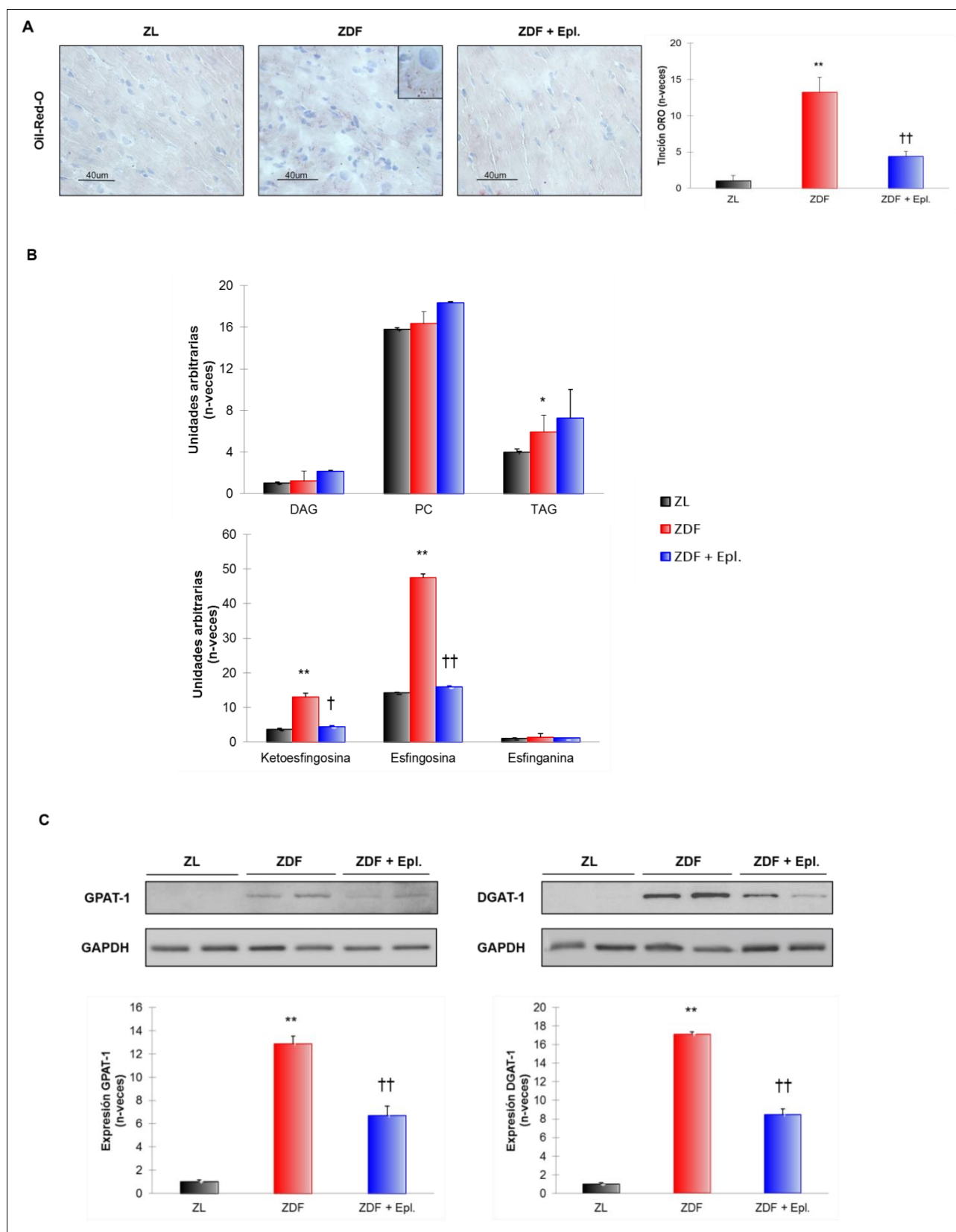
**Figura 22 - La eplerenona redujo la expresión y traslocación de FAT/CD36 en corazones ZDF.** Niveles de FAT/CD36 [~90 kDa (banda superior) y ~53 kDa (banda inferior); fracción de sarcolema y endosomal, (barras sólidas y rayadas en el gráfico de cuantificación), respectivamente] en los corazones ZL y ZDF±Eplerenona. \*\* $p < 0,01$  vs. ZL. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. ZDF.

Tras la entrada en la célula, los FAs son transportados a diferentes orgánulos para fines distintos. Mayoritariamente, los FAs se dirigen a la mitocondria para la obtención de energía mediante  $\beta$ -oxidación [152]. En este sentido, observamos que las ratas ZDF presentaron un incremento en la expresión del RNAm de FABP3, un transportador de FAs citosólico (figura 23 A), y de dos enzimas limitantes de la  $\beta$ -oxidación, ACADm y ACADI (figura 23 B).



**Figura 23 - La eplerenona disminuyó la expresión de proteínas de movilización y oxidación de FAs en ratas ZDF. (A) FABP3, (B) ACADI y ACADm. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. ZL. † $p < 0,05$  vs. ZDF.**

Los FAs también pueden ser derivados a re-esterificación lipídica para la síntesis de TAGs y fosfolípidos [153]. En este sentido, observamos mediante tinción con ORO numerosos acúmulos lipídicos en el miocardio de ratas ZDF (figura 24 A), constituidos principalmente por TAGs [46]. Precisamente, un incremento de TAGs también fue observado en extractos celulares de ratas ZDF por UHPLC-MS (figura 24 B). Además, las ratas ZDF mostraban un incremento de dos de las enzimas claves en la re-esterificación, GPAT-1 y DGAT-1 (figura 24 C). Finalmente, otro destino de los FAs puede ser la formación de metabolitos lipotóxicos, como las ceramidas [154]. En este sentido, se detectó un aumento de precursores esfingolipídicos tales como ketoesfingosina y esfingosina en miocardios ZDF (figura 24 B). De especial interés, el tratamiento con eplerenona fue capaz de reducir la esteatosis miocárdica por acúmulo de TAGs y la expresión de FABP3, GPAT-1 y DGAT-1, así como ketoesfingosina y esfingosina en corazones ZDF (figura 24).

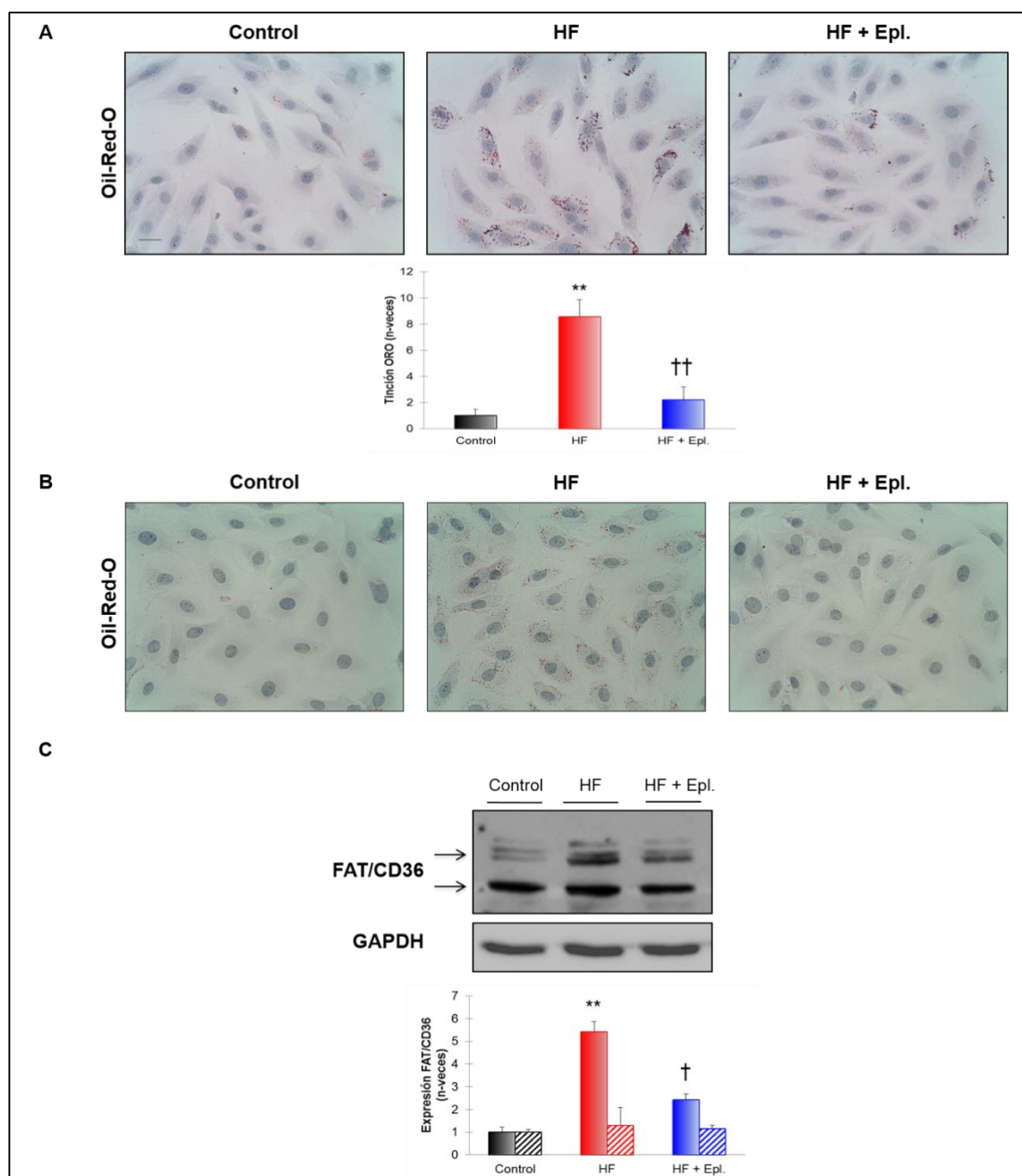


**Figura 24 - La eplerenona aminoró la esteatosis miocárdica y la reesterificación lipídica en ratas ZDF. (A)** Detección de lípidos intracelulares mediante ORO. Se muestra un detalle ampliado del miocardio ZDF (escala 5x). **(B)** Mediante UHPLC-MS, niveles tisulares de diacilglicerol (DAG), fosfatidilcolina (PC), TAGs y keto esfingosina, esfingosina y esfinganina. **(C)** Expresión de GPAT-1 (~90 kDa) y DGAT-1 (~52 kDa) en el modelo. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  vs. ZL. † $p < 0.05$  y †† $p < 0.01$  vs. ZDF.



## 6. La eplerenona disminuyó la asimilación y metabolismo lipídico en cardiomiocitos en cultivo.

Con el fin de valorar si la eplerenona reducía la esteatosis cardiaca de modo directo sobre el cardiomiocito, estimulamos las células en cultivo con HF y/o eplerenona. La incubación de cardiomiocitos H9c2 con HF 0,12 mM indujo esteatosis celular a partir de 6 horas de incubación. Sin embargo, el pretratamiento con eplerenona, a una dosis de  $10^{-6}$ M mitigó esta acumulación lipídica (figura 25 A).

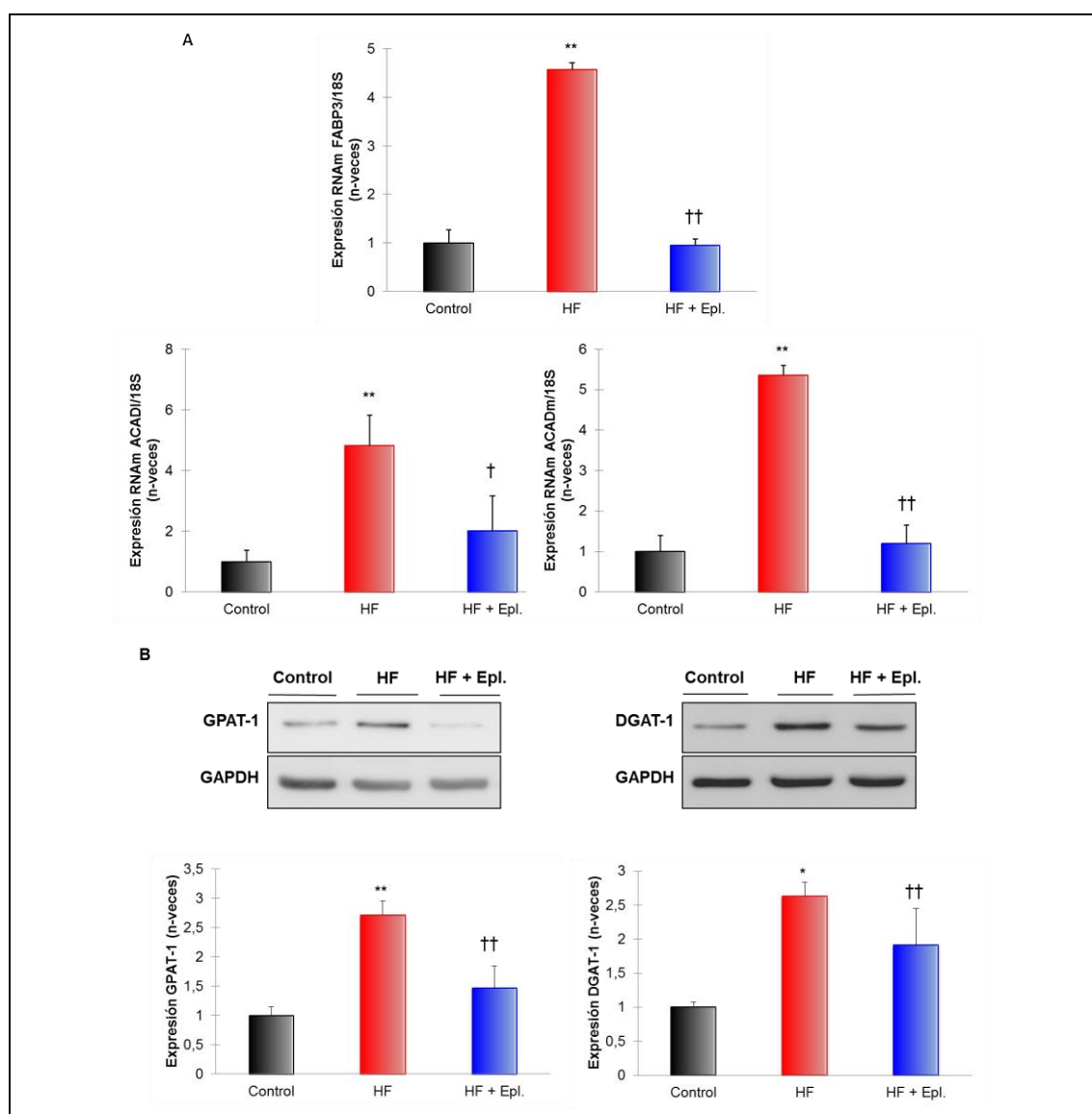


**Figura 25 - La eplerenona disminuyó la formación de acúmulos lipídicos y la expresión de FAT/CD36 en cardiomiocitos estimulados con HF.** (A) Detección de LD en células H9c2 y (B) C2C12. (C) Expresión de FAT/CD36 [~90 kDa (isoforma sarcolema) y ~53 kDa (isoforma endosomal)]; barras sólidas y barras rayadas en el gráfico de cuantificación, respectivamente. \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  vs. HF. †† $p < 0,01$  vs. HF.



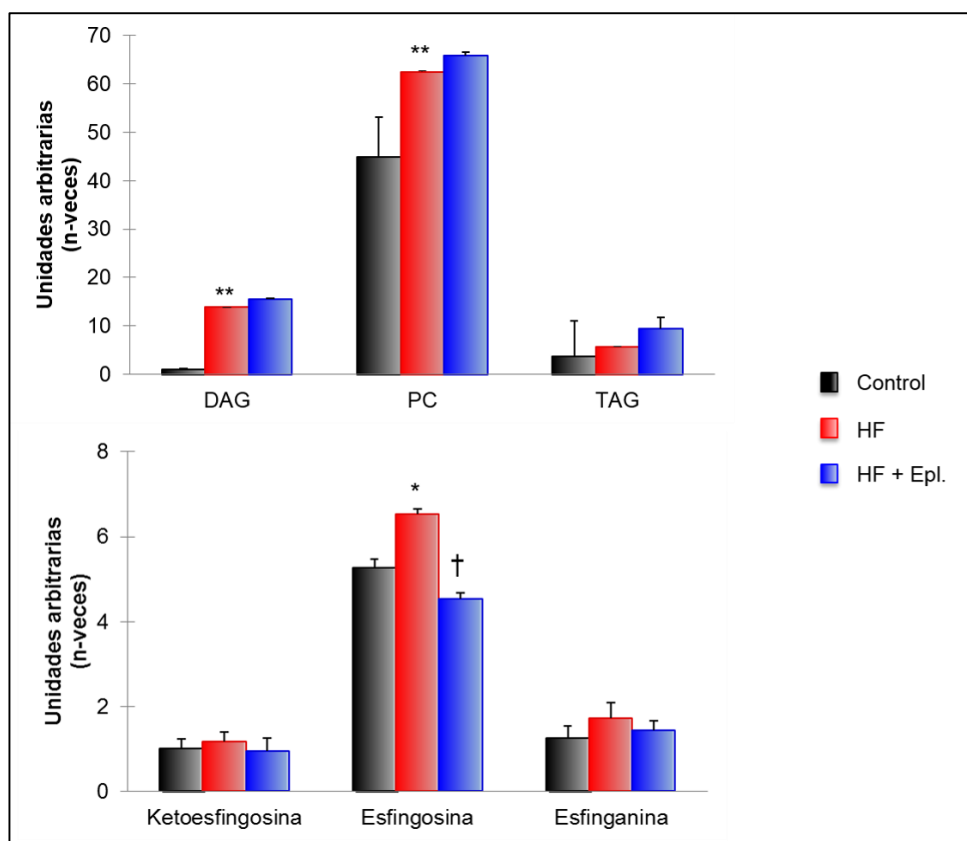
Sin embargo, datos previos sugieren que los cardiomiocitos H9c2 podrían poseer una baja expresión o carecer del receptor FAT/CD36 [155]. Por ello, utilizamos otra línea celular de cardiomiocitos (C2C12) con expresión demostrada de FAT/CD36 y metabolismo lipídico activado [156]. C2C12 presentaron igualmente incremento de acúmulos lipídicos (figura 25 B), así como una mayor expresión de las isoformas glicosilada/fosforilada de FAT/CD36 tras la estimulación con HF (figura 25 C).

Posteriormente estudiamos los niveles de RNAm de FABP3, ACADm y ACADI (figura 26 A) así como la expresión proteica de las enzimas GPAT-1 y DGAT-1 (figura 26 B). Todas se encontraron incrementadas tras la estimulación con HF. Sin embargo, el tratamiento con eplerenona mitigó la acumulación lipídica así como la expresión de FAT/CD36, FABP3, GPAT-1, DGAT-1 y enzimas de la  $\beta$ -oxidación ACADm y ACADI (figuras 25 y 26).



**Figura 26 - La eplerenona atenuó la expresión de enzimas metabólicas y de reesterificación lipídica en cardiomiocitos estimulados con HF. (A) Niveles de RNAm de FABP3, ACADm y ACADI. (B) Expresión proteica de GPAT-1 y DGAT-1. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. HF**

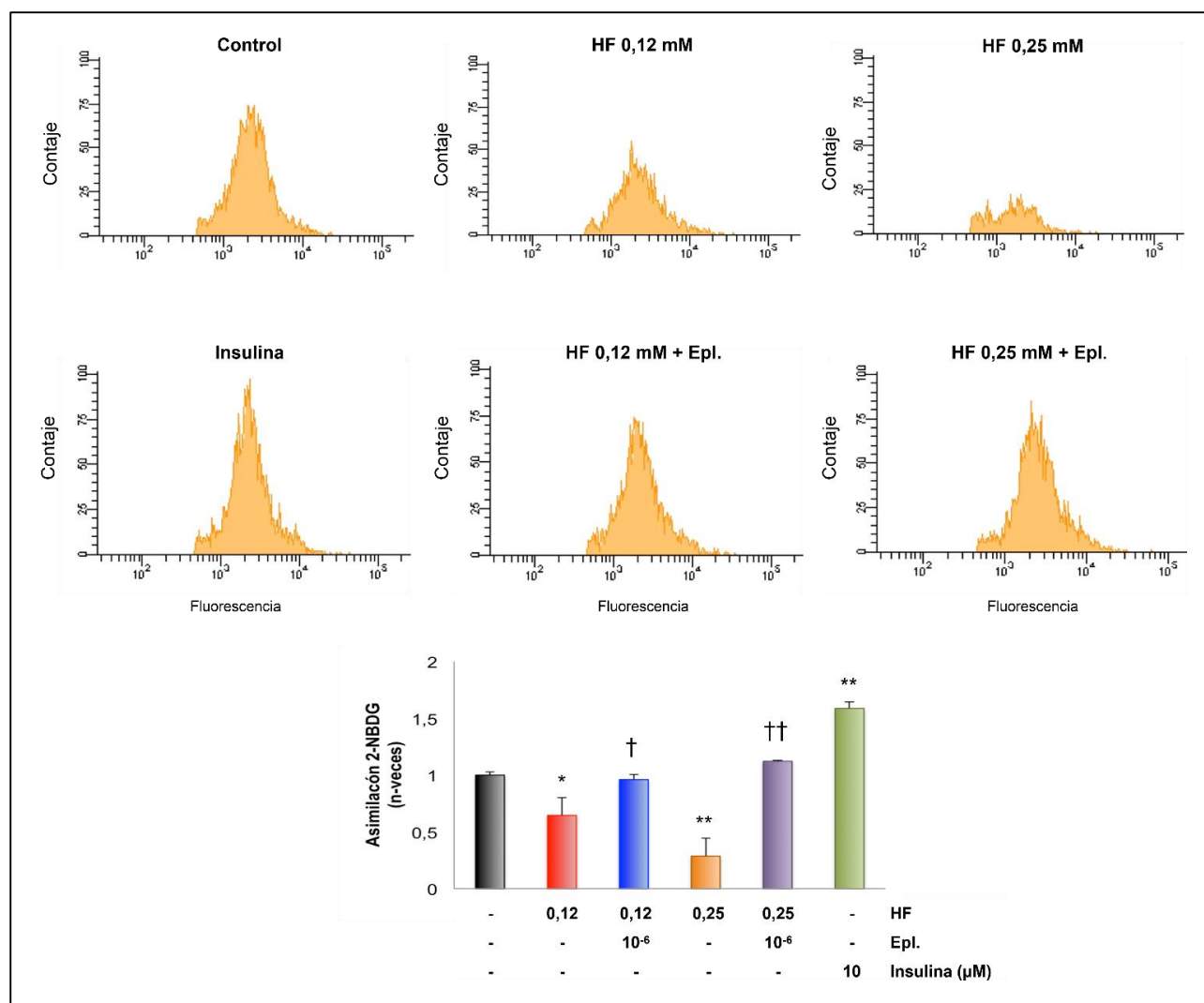
Además, se midieron los niveles de DAG, PC, TAGs, ketoesfingosina, esfingosina y esfinganina, tal como se había realizado para los corazones del modelo. DAG, PC y esfingosina se encontraron incrementados en C2C12 tras 12 horas de exposición a HF 0,12 mM. El tratamiento con eplerenona disminuyó la formación de esfingosina (figura 27). Estos datos sugieren un efecto directo de la eplerenona sobre la entrada de FAs y su utilización en el cardiomiocito.



**Figura 27 - La eplerenona redujo los niveles de esfingosina en cardiomiocitos estimulados con HF.** Por UHPLC-MS, niveles de DAG, PC y TAGs, y precursores esfingolípidos. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  vs. HF.

## 7. La eplerenona revirtió la asimilación de glucosa en cardiomiocitos tratados con HF

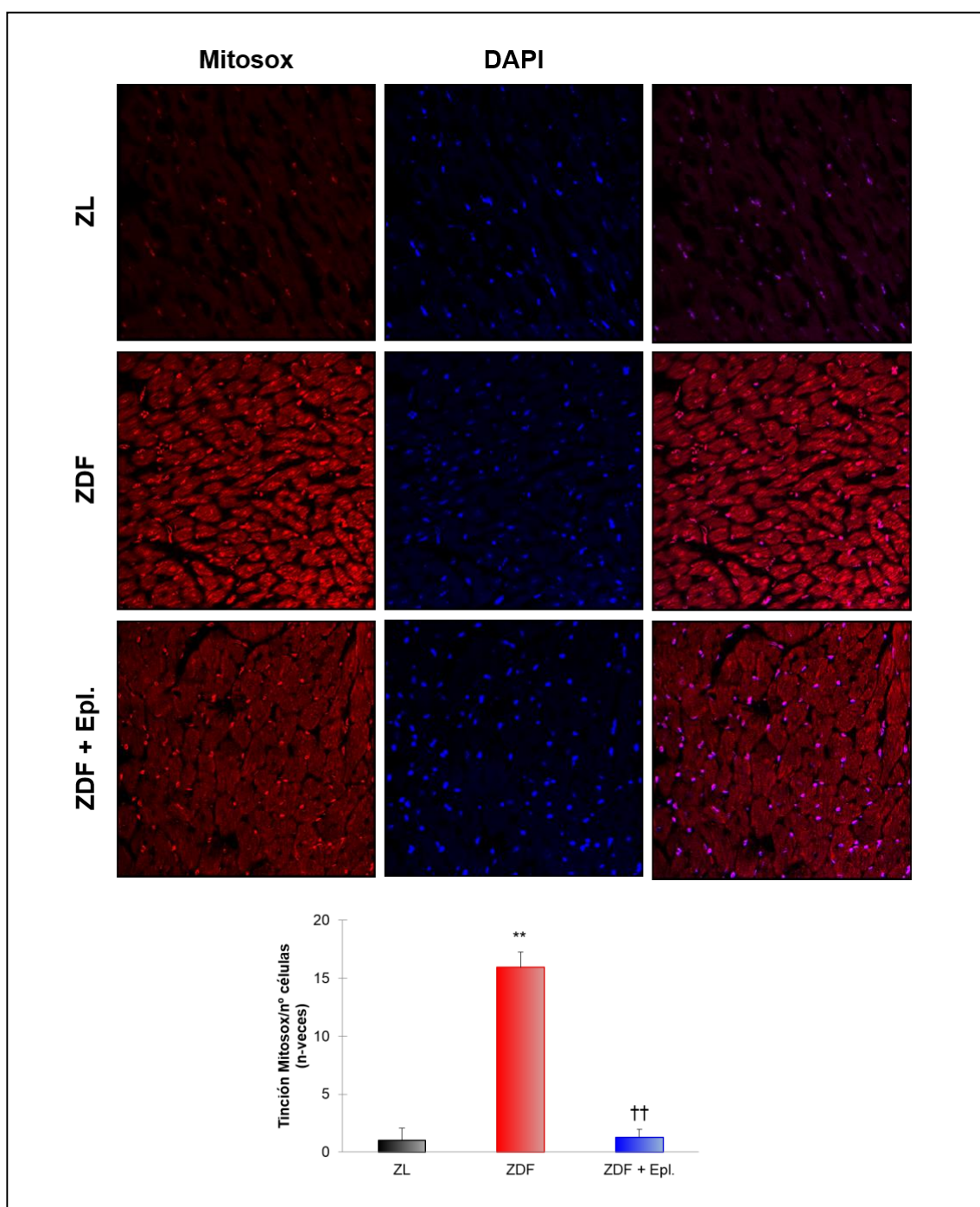
Como era previsible [157], HG no produjo esteatosis en cardiomiocitos en cultivo (no mostrado). Sin embargo, el exceso en el almacenaje y metabolismo lipídico inducidos por HF podrían afectar a la utilización de la glucosa [153]. A este respecto, se observó que tras 3 horas de estimulación con HF, los cardiomiocitos C2C12 mostraron un descenso significativo de la asimilación de glucosa (2-NBDG) y, de forma interesante, este hecho fue revertido también por el tratamiento con eplerenona (figura 28).



**Figura 28 - La eplerenona mejoró la asimilación de glucosa en C2C12 estimuladas con HF.** Tras la exposición a HF  $\pm$  eplerenona o insulina, los cardiomiocitos se incubaron con 2-NBDG para ser detectados por citometría de flujo. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. HF

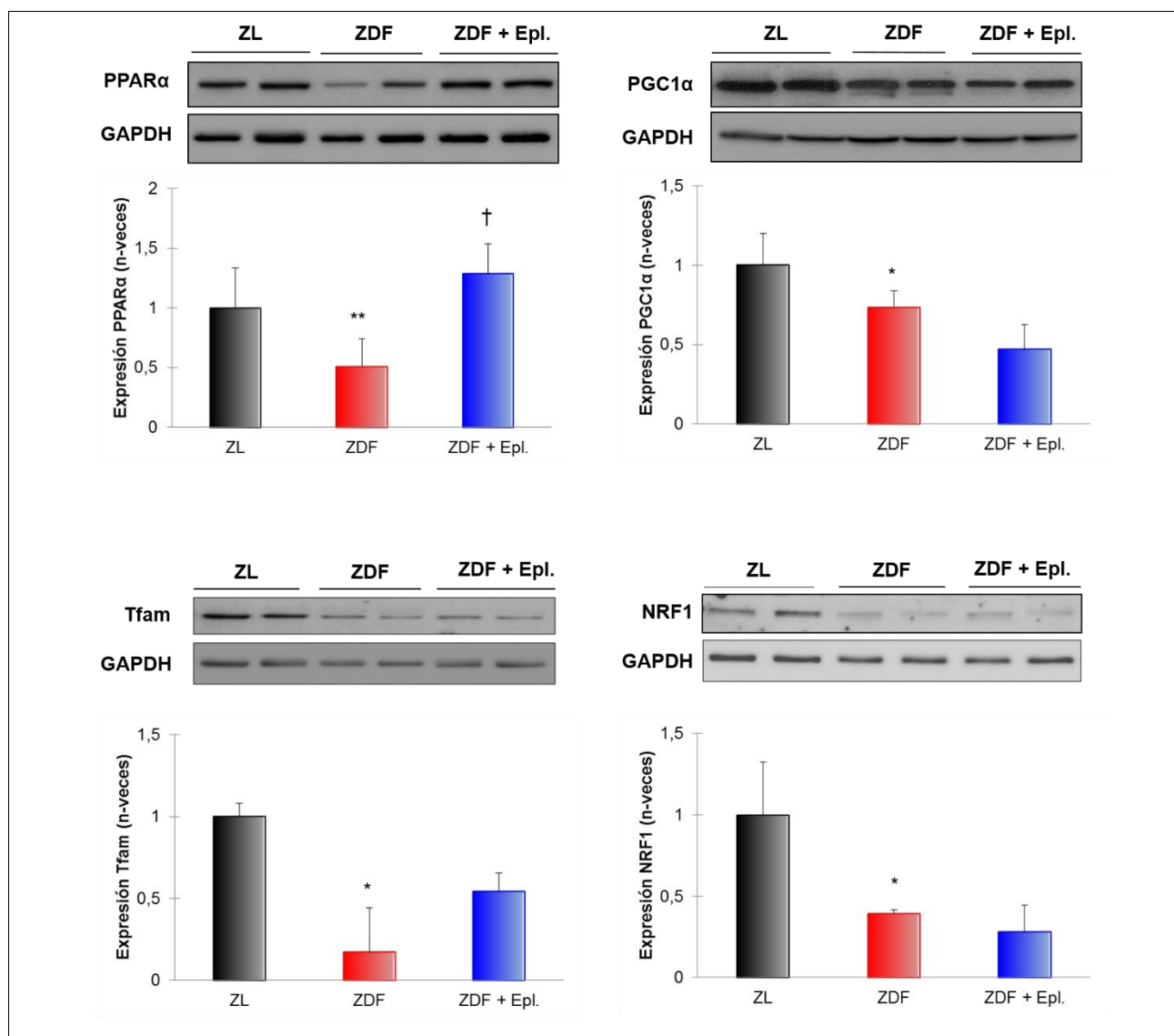
## 8. La eplerenona mejoró el estrés oxidativo sin afectar a proteínas reguladoras mitocondriales.

Finalmente, la apoptosis presente en el corazón ZDF y en cardiomiocitos expuestos a HF se ha relacionado también con una producción excesiva de ROS [158]. Las ratas ZDF mostraron un aumento de la producción de  $\text{O}_2^-$  a nivel citosólico (no mostrado) y, principalmente, mitocondrial (figura 29). De modo significativo, el tratamiento con eplerenona atenuó estos efectos.



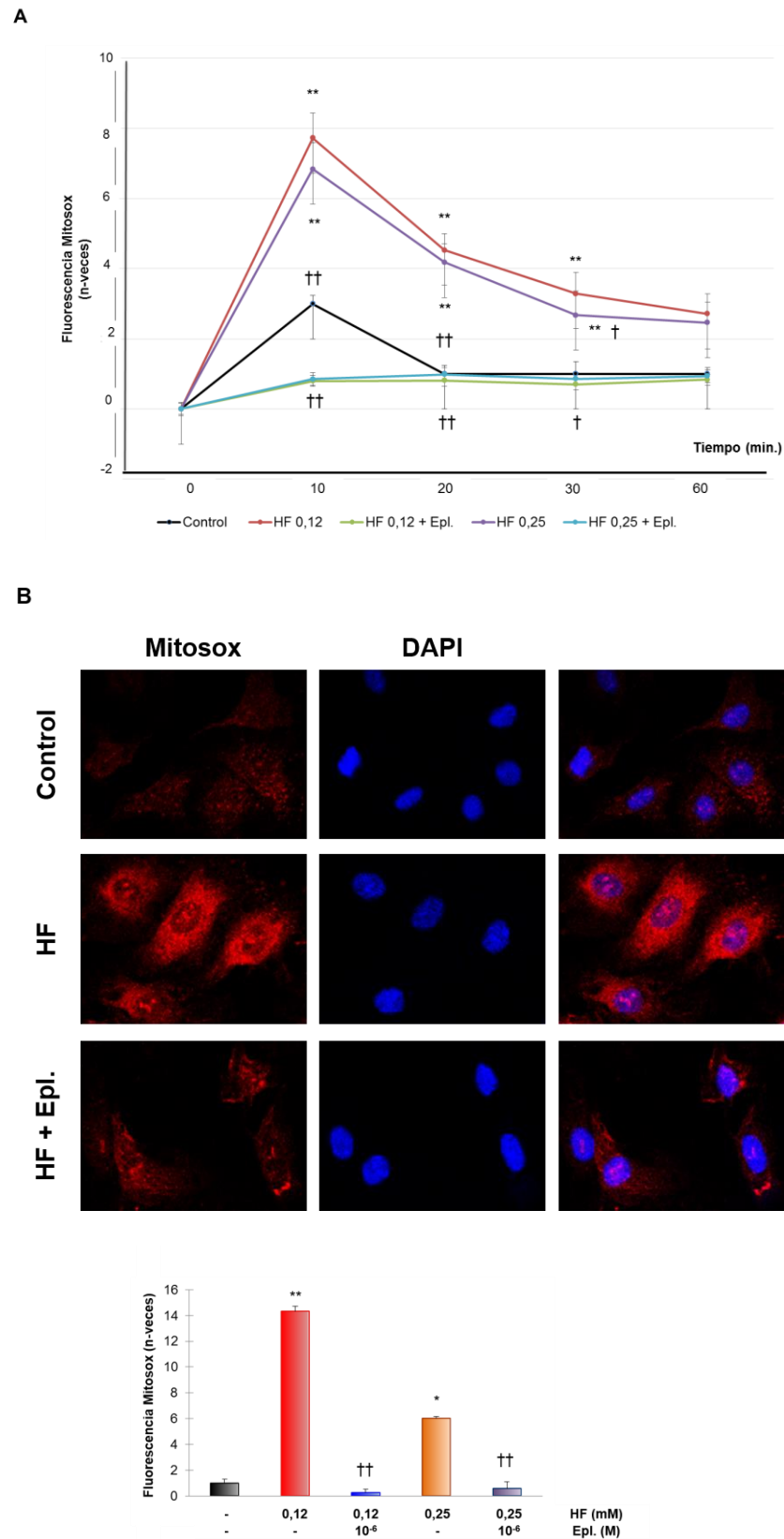
**Figura 29 - La eplerenona disminuyó los niveles de  $O_2^-$  mitocondriales en ratas ZDF.** La tinción con MitoSOX fue utilizada para detectar la producción de ROS mitocondrial. DAPI se empleó como marcador nuclear. \*\* $p < 0,01$  vs. ZL. †† $p < 0,01$  vs. ZDF.

Posteriormente estudiamos los niveles de proteínas reguladoras de la biogénesis mitocondrial como el complejo PPAR $\alpha$ /PGC1 $\alpha$ , y los factores de transcripción Tfam y NRF1. Ambos se encontraron reducidos de forma significativa en los corazones de ratas ZDF, sin embargo, tan solo PPAR $\alpha$  fue reestablecido con eplerenona (figura 30).



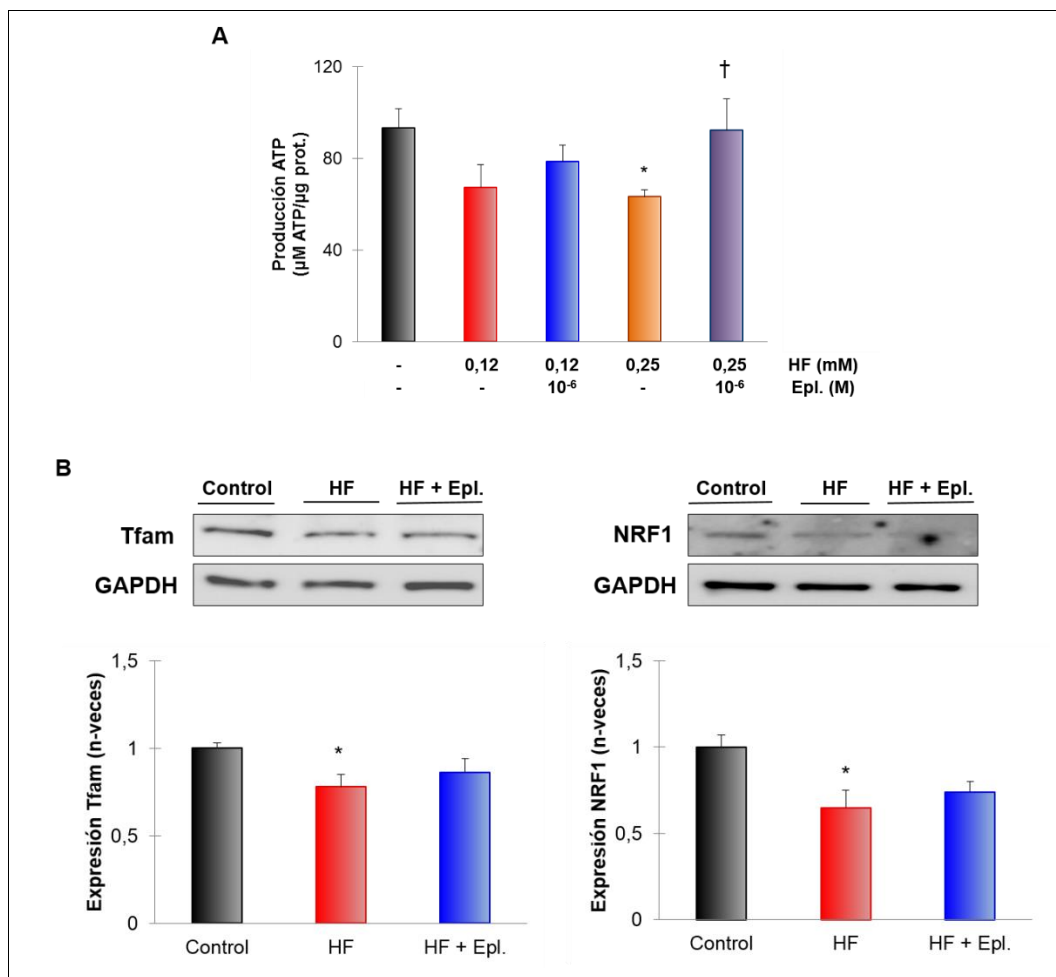
**Figura 30 - La eplerenona restauró la expresión de PPARα en el miocardio de ratas ZDF. Niveles de proteínas reguladoras mitocondriales.** \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  vs. HF.

Estos datos fueron confirmados en cardiomiocitos en cultivo. Mediante citometría de flujo (figura 31 A) e inmunofluorescencia (figura 31 B) se observó que células C2C12 estimuladas con HF durante tan sólo 10 minutos presentaban un incremento en la formación de  $O_2^-$  mitocondrial y que el tratamiento con eplerenona redujo esta producción.



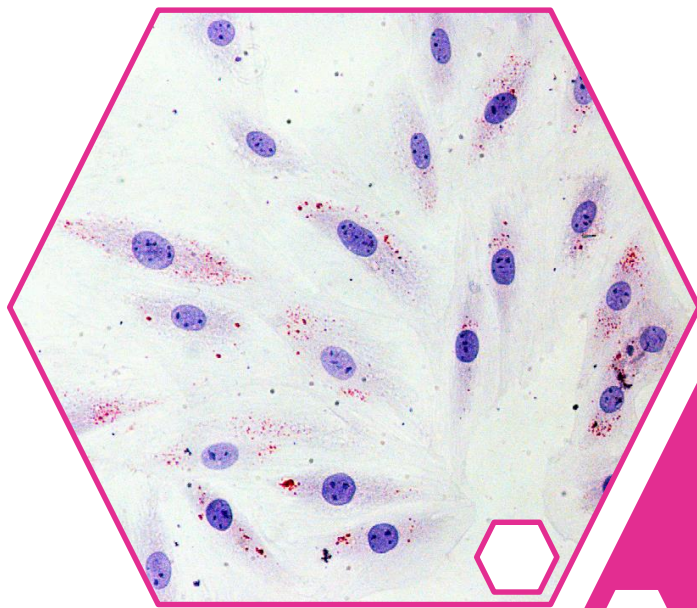
**Figura 31 - Efecto anti-oxidante de la eplerenona en cardiomiocitos estimulados con HF.** (A) Por citometría de flujo, niveles de fluorescencia de MitoSOX. (B) Mediante microscopía confocal, imágenes y cuantificación de cardiomiocitos incubados con MitoSOX (10 minutos) tras estimulación con HF±eplerenona. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. HF.

La producción de ATP también se vio reducida en cardiomiocitos estimulados con HF mientras que el pretratamiento con eplerenona revirtió esta acción (figura 32 A). Además, HF (0,25 mM) no alteró la relación PPAR $\alpha$ /PGC1 $\alpha$  (no mostrado), aunque sí redujo la expresión de Tfam y NRF1 (figura 32 B). De nuevo, la eplerenona no fue capaz de prevenir estas respuestas.



**Figura 32 - La eplerenona restauró la producción de ATP sin afectar a proteínas reguladoras mitocondriales. (A)** Síntesis de ATP en C2C12 estimulados con HF±eplerenona. **(B)** Niveles proteicos de Tfam y NRF1 en cardiomiocitos incubados con HF±eplerenona. \* $p < 0,05$  vs. control. † $p < 0,05$  vs. HF.

Por tanto, la eplerenona, a través del bloqueo de MR, además de prevenir la hiperlipemia, fibrosis e hipertrofia cardíaca podría reducir directamente la entrada de FAs en el cardiomiocito, su acumulación, y producción de ROS mitocondrial, contribuyendo así a la mejora de la disfunción diastólica observada en la rata ZDF.



*RESULTADOS II*


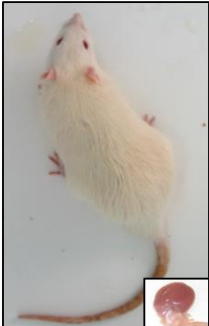





En esta segunda parte de resultados, estudiamos el efecto de la sitagliptina en la patología cardíaca inducida por DM2. El tratamiento con eplerenona había sido capaz de reducir la lipotoxicidad en el miocardio DM2/obeso sin afectar a la hiperglicemia. Así, nuevas estrategias terapéuticas que pudieran regular la utilización de lípidos y/o glucosa, como principales sustratos energéticos del corazón, podrían resultar beneficiosas en la mejora de la función cardíaca del paciente DM2. En este sentido, la estimulación del sistema incretina ha demostrado efectos hipoglicemiantes y cardioprotectores en modelos experimentales de isquemia-reperfusión [159], pero no se conoce al completo su acción sobre el miocardio DM2.

### 1. La sitagliptina atenuó la hiperglicemia y resistencia a insulina en ratas GK

Las ratas GK (DM2, no obesas) mostraron unos niveles circulantes elevados de glucosa y lípidos (Ch, TAG y FFAs) en comparación con el grupo control. Sin embargo, tras 20 semanas de tratamiento, la sitagliptina (10mg/Kg/día) atenuó de forma significativa la hiperglicemia, aunque no produjo cambios significativos en el perfil lipídico (figura 33).

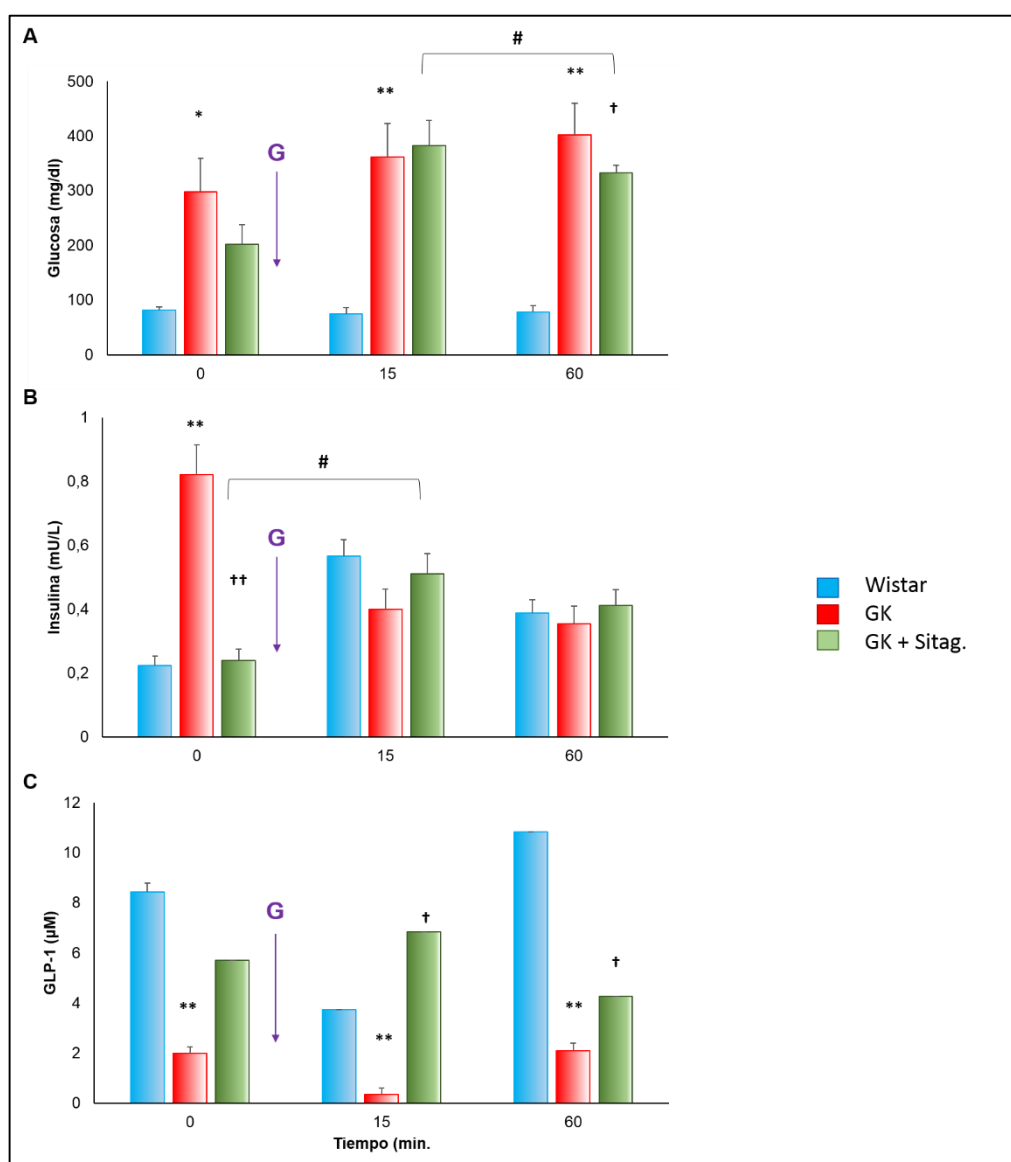
	Wistar	GK	GK + Sitag.
			
<b>Peso (g)</b>	476.25±39.4	368.14±38.9**	382.5±49.75
<b>HW/BW</b>	3.93±0.95	4.10±0.36	4.13±1.44
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	208.62±37.11	452.14±63.93**	322.93±45.88††
<b>Ch (mg/dl)</b>	86.37±17.77	148.71±31.81*	100±10.33
<b>TAG (mg/dl)</b>	69.75±14.08	126.5±73.85**	112.16±58.57
<b>FFA (mM)</b>	1.05±0.43	2.01±0.42**	1.56±0.74
<b>HDL (mg/dl)</b>	48.5±7.11	64.14±11.93*	60.33±5.24
<b>Ch no HDL (mg/dl)</b>	37.87±10.77	58.16±19.23*	39.66±8.04
<b>LDL (mg/dl)</b>	23.75±11.14	31.28±19.37	17.5±11.64

**Figura 33 - La administración de sitagliptina redujo la hiperglicemia en ratas GK.** Se muestran valores de glucosa y perfil lipídico circulantes, y el peso relativo del corazón (HW/BW). Mismas abreviaturas que en figura 14. \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs. Wistar; ††p<0,01 vs. GK.

La sitagliptina mejoró también la disfunción renal de las ratas GK. En este sentido, el análisis de la proteinuria realizado en la orina de las ratas del modelo arrojó los siguientes resultados para Wistar, GK y GK+Sitag., respectivamente: 1,1±0,9; 4,8±1,2 y 3,7±1,4 µg/día, p<0,05.

Además, mediante el test de tolerancia a glucosa (OGTT) se observó que GK en ayuno mostraba unos niveles plasmáticos elevados de glucosa e insulina, y niveles muy reducidos de GLP-1 (figura 34 A-C;

ver 0 min). Transcurridos 15 minutos de la sobrecarga oral de glucosa, las ratas GK respondían de forma anómala sin incrementar los niveles de insulina y GLP-1 (figura 34 B y C), sugiriendo la existencia de resistencia a insulina, y el descontrol de la glicemia (figura 34 A). Sin embargo, GK tratadas con sitagliptina respondieron a la sobrecarga de glucosa incrementando los niveles de insulina y GLP-1 tras 15 minutos (figura 34 B y C) y disminuyendo la glicemia al cabo de 60 minutos (figura 34 A). Además, el índice HOMA-IR, como medida del grado de resistencia a insulina [160], se encontró elevado en GK, y revertido con sitagliptina (1,03; 7,2 y 2,19 para Wistar, GK y GK + Sitag., respectivamente,  $p<0,01$ ).

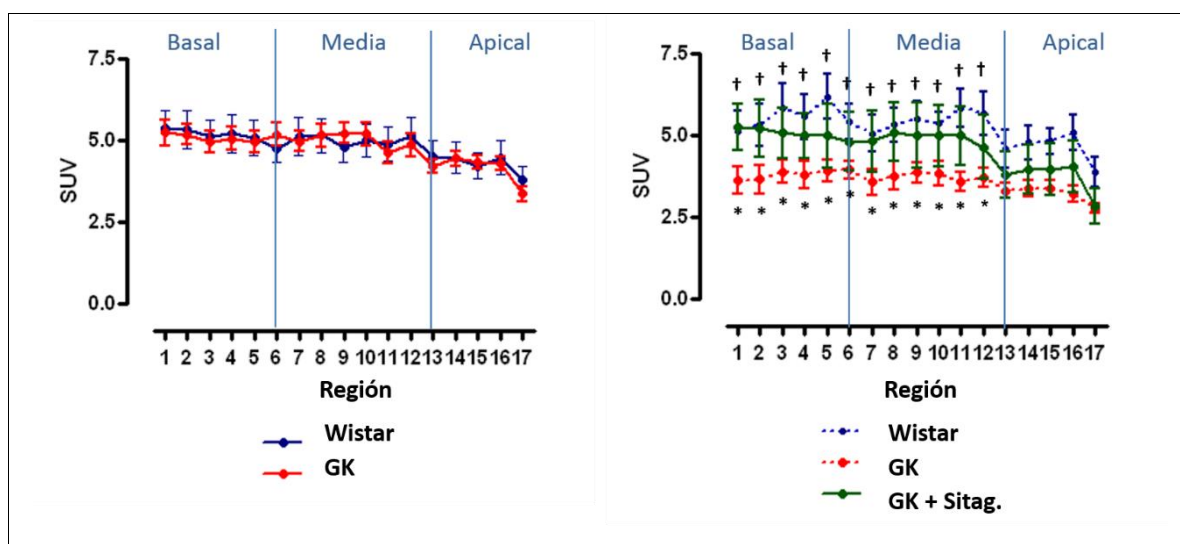


**Figura 34 - La sitagliptina aminoró la resistencia a insulina y restauró los valores de GLP-1 plasmáticos en ratas GK.** Resultados del test OGTT en los tres grupos de ratas. Valores plasmáticos de: (A) glucosa, (B) insulina y (C) GLP-1 antes (ayunas) y tras 15 y 60 minutos de sobrecarga de glucosa (G; 0,5 g/kg peso corporal). \* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$  vs. Wistar; † $p<0,05$  y †† $p<0,01$  vs. GK. # $p<0,05$  vs. 15' sobrecarga o ayuno.

Por otro lado, la concentración plasmática de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ , y marcadores de daño renal severo (urea, urea nitrogenada, creatinina y albúmina) y hepático (aspartil y alanina aminotransferasas), así como la presión sistólica se mantuvieron dentro del rango de normalidad en todos los grupos (no mostrado).

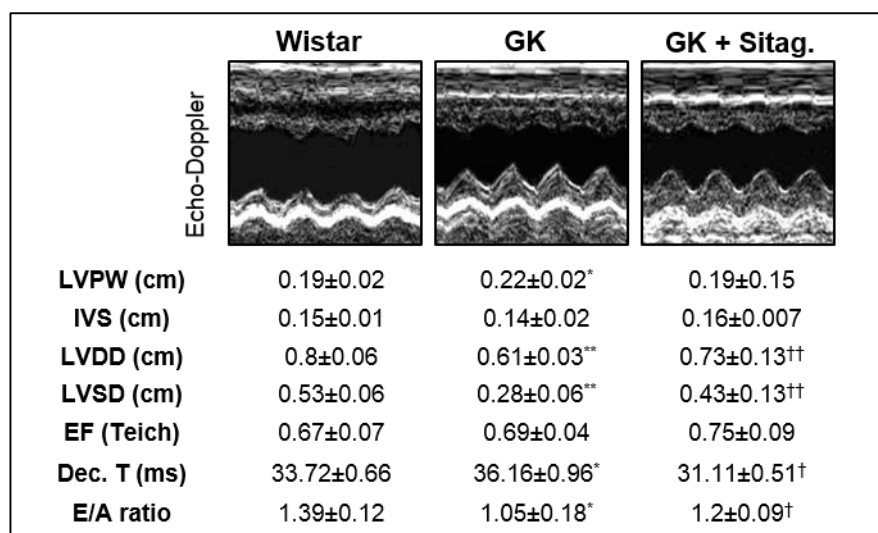
## 2. La sitagliptina mejoró la asimilación de glucosa y la disfunción diastólica del miocardio GK

El descenso de hiperglicemia y resistencia a insulina producidos por la sitagliptina podrían influir en la asimilación de glucosa por el miocardio. Previo al tratamiento (semana 25), se inyectó  $^{18}\text{F}$ -FDG a las ratas para visualizar por PET/CT su distribución en el miocardio. En este estadio, no se observaron diferencias en la asimilación de  $^{18}\text{F}$ -FDG entre GK y Wistar (figura 35, izquierda). Sin embargo, justo antes del sacrificio (tras 45 semanas), mediante micro-PET observamos que los corazones GK mostraban un declive en la asimilación de  $^{18}\text{F}$ -FDG, concretamente en las regiones basal y media del corazón (segmentos 1-12) (figura 35, derecha). El tratamiento con sitagliptina mejoró la asimilación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en el miocardio GK en estas mismas regiones (figura 35).



**Figura 35 - La sitagliptina aumentó la asimilación de glucosa en corazones GK.** Asimilación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en los corazones del modelo. A la izquierda se muestran los valores de PET previos al inicio del tratamiento. A la derecha, los niveles tras la finalización de la administración de sitagliptina. \* $p < 0,05$  vs. Wistar. † $p < 0,05$  vs. GK.

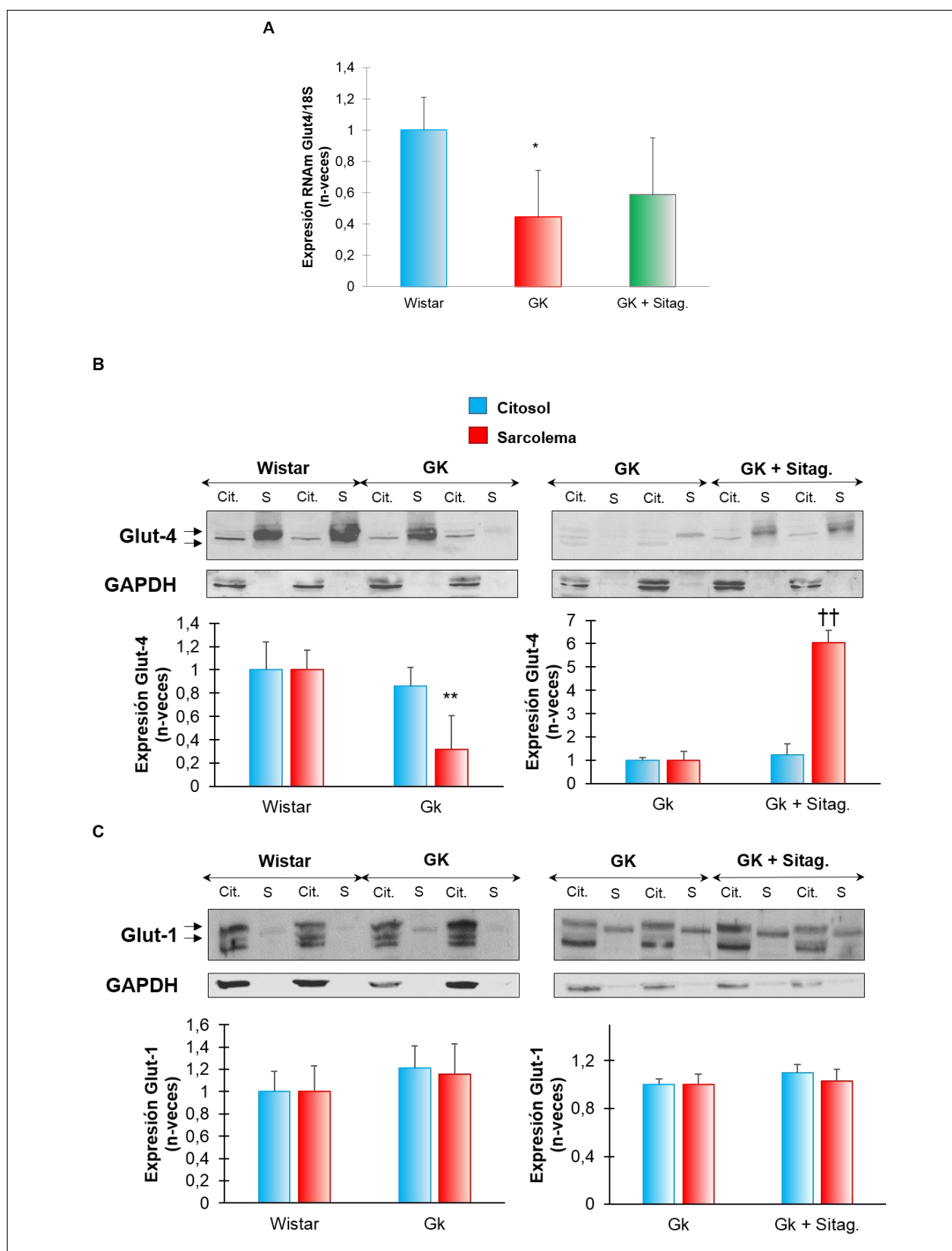
Un defecto en la asimilación de glucosa en el corazón DM2 podría asociarse a una disfunción cardíaca [161]. Mediante Eco-Doppler observamos que, efectivamente, el grupo GK mostró un incremento significativo del grosor de la pared posterior (LVPW) y una reducción de los diámetros diastólico y sistólico del VI (LVDD y LVSD), característico de fenómenos de hipertrofia cardíaca, pero no se observó variación en la fracción de eyección. Sin embargo, se detectó una prolongación del tiempo de deceleración (Dec. T) y un descenso del ratio E/A, sugiriendo disfunción diastólica. De gran interés, el tratamiento con sitagliptina redujo la hipertrofia y normalizó la función diastólica (figura 36).



**Figura 36 – La sitagliptina aminoró la disfunción diastólica en ratas GK.** Imágenes representativas de Echo-Doppler y parámetros cardíacos para cada grupo de ratas del modelo. Mismas abreviaturas que en figura 16. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. Wistar; † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. GK.

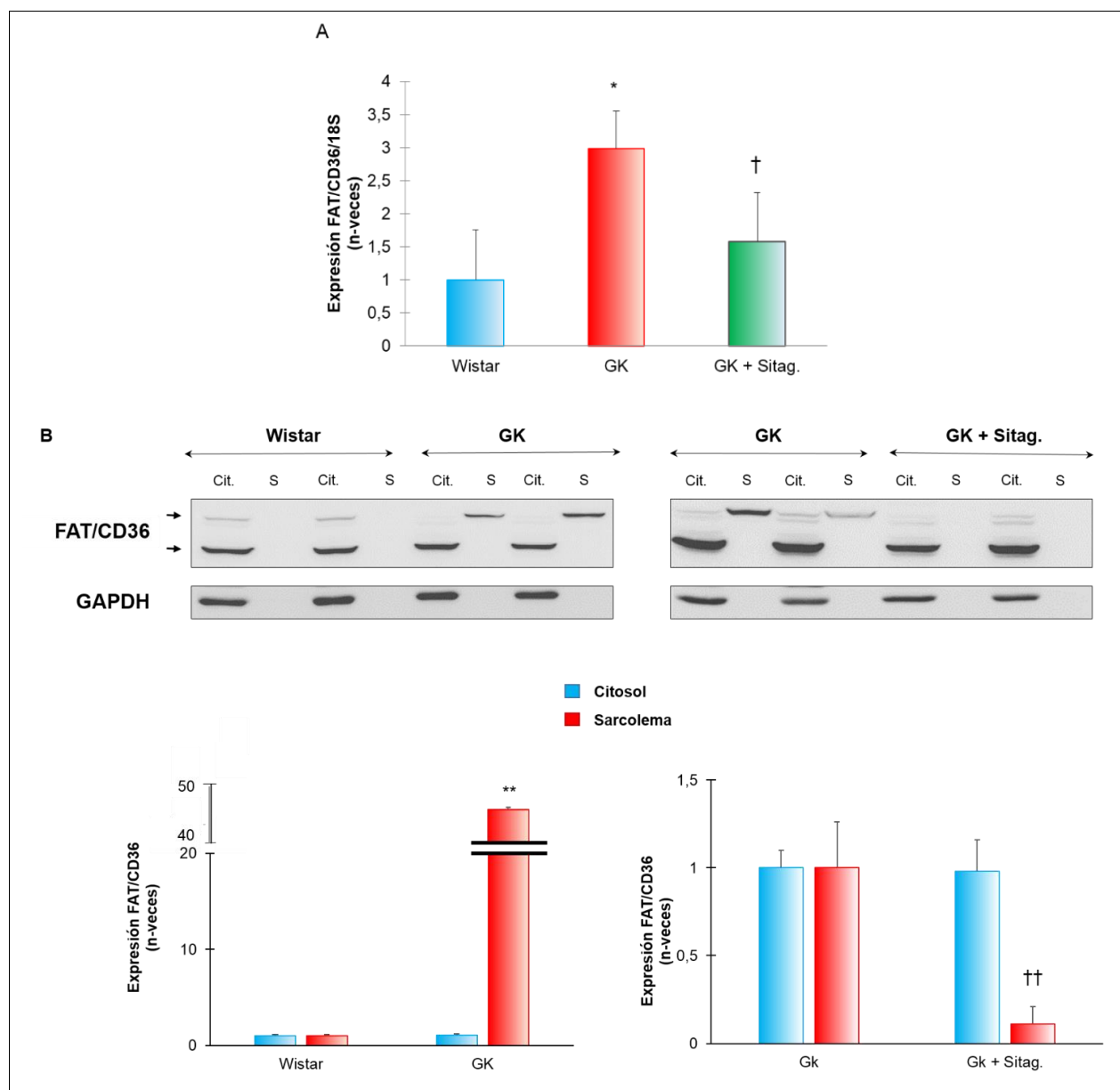
### 3. La sitagliptina incrementó la expresión y translocación de Glut4 en detrimento de FAT/CD36 en el miocardio GK

La asimilación de glucosa cardíaca podría depender de la expresión y localización de los transportadores de glucosa Glut4 y Glut1 [162]. Los corazones de ratas GK mostraron una reducción de los niveles de RNAm de Glut4 y de su presencia en el sarcolema (figura 37 A y B). El tratamiento con sitagliptina no modificó los niveles de RNAm de Glut4 pero restauró su translocación del citosol al sarcolema (figura 37 A y B). Aunque Glut1 es considerado un transportador de glucosa basal, éste podría compensar el defecto en la translocación de Glut4, tal como ocurre en corazones hipertróficos o bajo hipertensión [163, 164]. Sin embargo, en GK, Glut1 parece no sufrir cambios significativos a nivel citosólico (endosomal) o del sarcolema (figura 37 C).



**Figura 37 - La sitagliptina aumentó la translocación del receptor Glut4 al sarcolemma en ratas GK sin afectar a Glut1.** Niveles cardiacos de Glut4 (~55 y 60 kDa fracción citosólica y de sarcolemma, respectivamente) y Glut1 (~40 y 55 kDa, respectivamente). \* $p < 0,01$  vs. Wistar. †† $p < 0,01$  vs. GK.

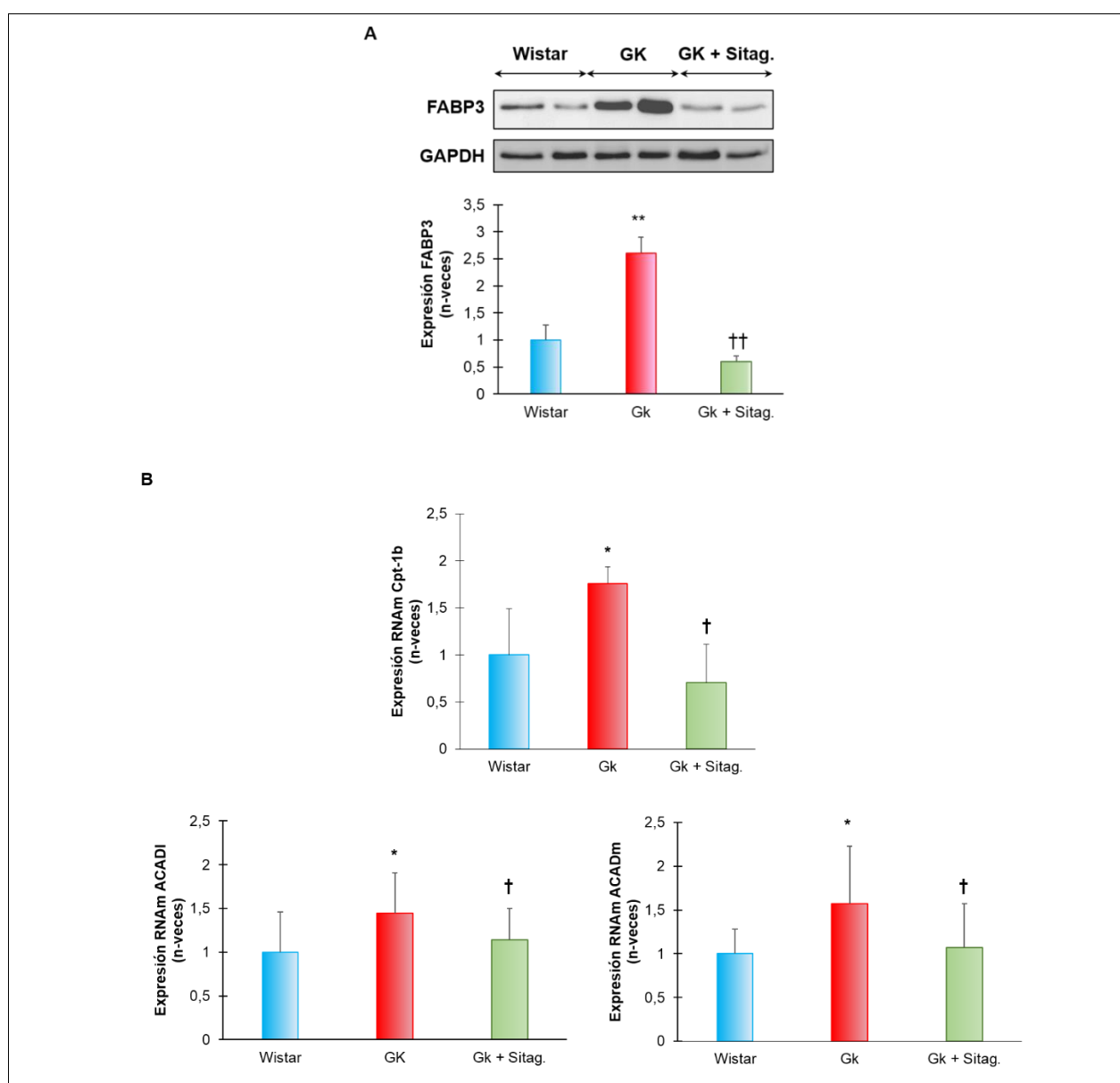
Dado que los metabolismos de glucosa y FAs en el corazón podrían estar estrecha e inversamente relacionados [66], también estudiamos los niveles de FAT/CD36 en el modelo. De manera interesante, en GK se observó que la expresión del RNAm (figura 38 A) así como la translocación de FAT/CD36 de citosol a sarcolema aumentaba en el miocardio GK (figura 38 B) y, además, ambos valores fueron aminorados por el tratamiento con sitagliptina.



**Figura 38 - La sitagliptina disminuyó la expresión y translocación de FAT/CD36 en corazones GK. (A)** Niveles de expresión de RNAm de FAT/CD36. **(B)** Expresión proteica de FAT/CD36 citosólica (~53 KDa, banda inferior) y de sarcolema (~90 KDa, banda superior). \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. Wistar. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. GK.

#### 4. La sitagliptina redujo el metabolismo de FAs y mejoró la utilización de la glucosa en el miocardio GK

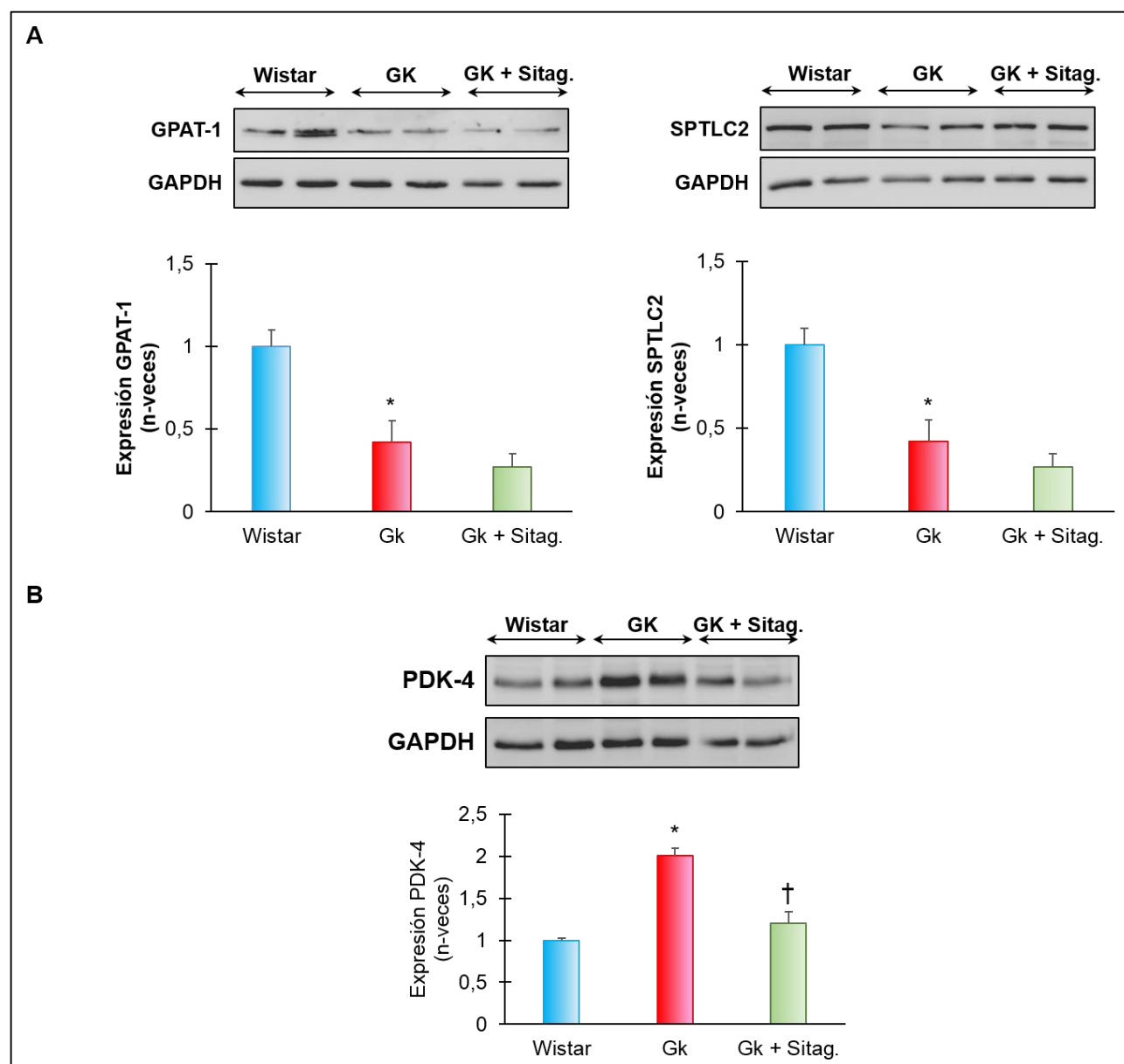
El descenso de FAT/CD36 en el sarcolema inducido por sitagliptina podría implicar una menor entrada de FAs, y, por tanto, menor tasa de oxidación, resíntesis a TAGs y/o formación de metabolitos lipídicos. Por diversas dificultades técnicas (vida media de  $^{11}\text{C}$ -palmitato  $\sim 20$  min.), no se pudo evaluar la entrada de FAs en el miocardio. En cambio, analizamos importantes mediadores de su transporte y oxidación. Efectivamente, los niveles de FABP3, elevados en GK, fueron normalizados tras la administración de sitagliptina (figura 39 A). La enzima carnitina palmitoil transferasa-1b (Cpt-1b), que controla la entrada de FAs a la mitocondria, así como ACADI y ACADm, exhibieron similar respuesta (figura 39 B).



**Figura 39 - La sitagliptina redujo la expresión de FABP3 y de proteínas de degradación de FAs en ratas GK. (A)** Expresión proteica de FABP3. **(B)** Expresión de RNAm de Cpt-1b, ACADI y ACADm. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. Wistar. † $p < 0,05$  y †† $p < 0,01$  vs. GK.



Sin embargo, la resíntesis lipídica y la formación de metabolitos lipídicos no se observó afectada por sitagliptina. GPAT-1 y SPTLC2, fueron atenuadas en GK pero no variaron tras el tratamiento (figura 40 A).

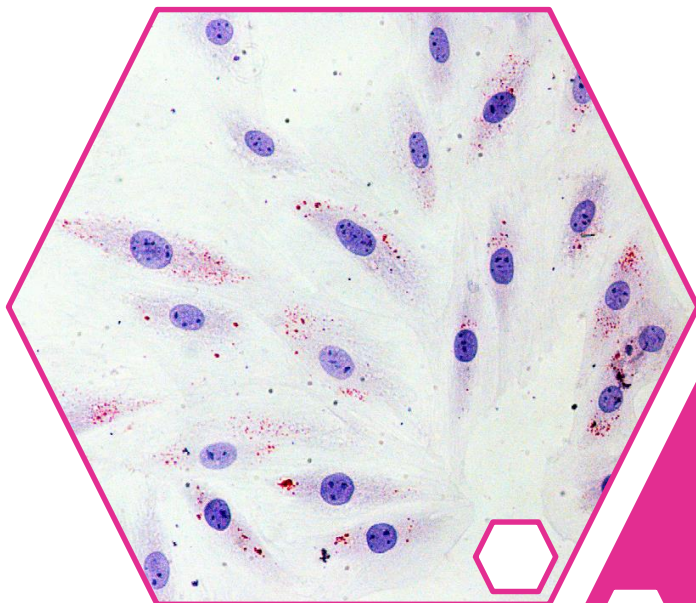


**Figura 40 - La sitagliptina no modificó la expresión de proteínas clave de resíntesis lipídica y biosíntesis de ceramidas y aminó la expresión de PDK-4 en corazones GK. (A) Expresión de GPAT-1 y SPTLC2 en el modelo GK. (B) Expresión de PDK-4 en el modelo GK. \* $p < 0,05$  vs. Wistar. † $p < 0,05$  vs. GK.**

Estos datos sugieren que la mayor parte de los lípidos asimilados por el miocardio GK podrían ser utilizados para la consecución de energía por  $\beta$ -oxidación, y la sitagliptina podría atenuar este proceso en favor de la degradación de glucosa. En este sentido, la enzima inhibitoria del complejo multienzimático PDH vinculado a la glicolisis, la piruvato deshidrogenasa kinasa-4 (PDK-4), se encontraba elevada en ratas GK y disminuía tras la administración de sitagliptina (figura 40 B).

Por tanto, la sitagliptina podría mejorar la función cardiaca del corazón DM2, no sólo mediante la mejora de la resistencia a insulina, sino además probablemente mediante la regulación de la asimilación y utilización de glucosa en detrimento de los FAs.





*DISCUSIÓN*



### *Potenciales terapias frente a la miocardiopatía diabética: bloqueo del receptor de mineralocorticoides y estimulación del sistema incretina*

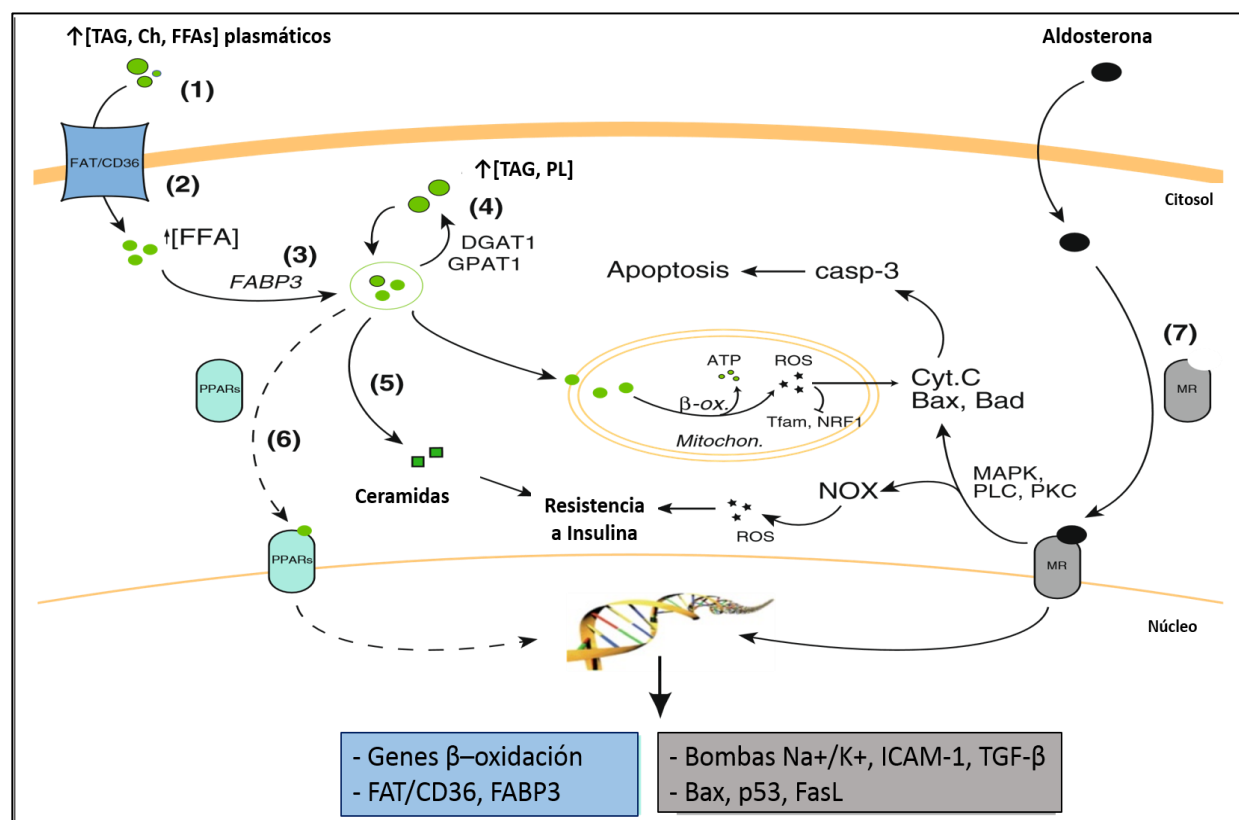
La MCD se produce como resultado de un conjunto de alteraciones funcionales y fisiológicas provocadas por el efecto directo de la DM sobre el corazón e independientemente de la presencia de afectación vascular u otra cardiopatía. El exceso de glucosa y lípidos circulantes junto a la resistencia a insulina periférica producen un aumento en la asimilación y utilización de FAs en detrimento de la glucosa. La hiperglicemia crónica está relacionada con el desarrollo de fibrosis cardíaca, enfermedad coronaria y un aumento del riesgo de infarto de miocardio [165]. Sin embargo, estudios clínicos recientes revelan que un control glicémico intenso ( $HbA_{1c} < 7\%$ ) no reduce la incidencia de accidentes cardiovasculares ni la mortalidad en pacientes DM2 [166]. Por otro lado, el contenido elevado de lípidos en el músculo cardíaco y el consiguiente aumento de apoptosis y disfunción cardíaca son hechos característicos de la MCD humana y experimental [30]. Además, la esteatosis y lipotoxicidad cardíaca favorecen el desarrollo de resistencia a insulina en el paciente DM2, y fármacos que estimulan la secreción de insulina, como la metformina, mejoran el desarrollo de la MCD [9]. Estos datos sugieren la necesidad de dirigir terapias, además, hacia eventos no glicémicos como son la lipotoxicidad y la resistencia a insulina.

Más allá de la función clásica de la aldosterona sobre la estimulación de la reabsorción renal de sodio y agua, y excreción de potasio, la aldosterona puede inducir acciones directas y tempranas en el corazón al unirse a los MR [100]. Entre ellas, y de modo independiente a las acciones de Ang-II, se han observado fenómenos de hipertrofia, inflamación y fibrosis [167]. La hipertrofia cardíaca constituye una de las principales respuestas del cardiomiocito que, en un principio, le permite aumentar su contractilidad. Sin embargo, en fases más avanzadas puede reducirse y derivar en insuficiencia cardíaca [168]. La inflamación promueve un aumento del reclutamiento e infiltración de células leucocitarias que, a su vez, producen más citoquinas pro-inflamatorias y deterioro de la función cardíaca. La fibrosis intersticial disminuye la velocidad de propagación del impulso cardíaco y potencia las acciones de las catecolaminas, reduciendo la actividad de los barorreceptores e induciendo la aparición de arritmias. En nuestro modelo, las ratas ZDF presentaron disfunción diastólica en paralelo a resistencia a insulina, y aumento del ratio HW/BW, incremento del grosor del IVS y mayor expresión de ANP, hechos característicos de hipertrofia cardíaca. ZDF presentaron también fibrosis intersticial y perivascular, e incremento de colágeno tipo-IV y FN-1. La hipertrofia y fibrosis de los cardiomiocitos podrían constituir respuestas adaptativas a la pérdida de éstos por apoptosis [36], la cual, es determinante en la disfunción diastólica y/o sistólica del paciente, y posterior evolución a insuficiencia cardíaca [169]. El cambio de sustrato energético, la sobrecarga mecánica y la lipotoxicidad asociada, así como la sobreactivación del sistema RAAS parecen ser los principales inductores de apoptosis en el cardiomiocito DM2/obeso [170]. En este sentido, las ratas ZDF y los cardiomiocitos estimulados con HF mostraron también apoptosis y activación de caspasa-3. Sin embargo, el tratamiento con eplerenona en ZDF corrigió la hipertrofia y fibrosis del VI, corroborando datos previos en MCD experimental y humana [149]. En el estudio EPHEBUS, pacientes con disfunción sistólica de VI postinfarto recuperaron la función cardíaca y experimentaron una mejora de los procesos de hipertrofia, fibrosis, inflamación y disfunción

endotelial cardiovascular tras el tratamiento con eplerenona [147]. De interés, eplerenona además mostró un efecto anti-apoptótico directo que podría repercutir en la mejora de la función cardíaca de los animales. Sin embargo, no se conoce el efecto de la eplerenona en la regulación del metabolismo lipídico. La entrada de FAs al corazón no está regulada de forma hormonal, como ocurre con la glucosa, y es dependiente de la disponibilidad de los lípidos circulantes [171]. En esta Tesis demostramos inicialmente que la eplerenona redujo la hiperlipemia en ratas ZDF sin afectar a los niveles de glucosa circulantes. Datos similares se han encontrado en ratones DM2/obesos [172] e individuos con hipertensión [173]. Los mecanismos celulares por los que la eplerenona reduce la hiperlipemia son desconocidos. En este sentido, el tratamiento con eplerenona podría prevenir la reducción de adiponectina y aumento de leptina en el tejido adiposo, que influiría en la liberación de lípidos y en su absorción intestinal [172]. Además, la sobrenutrición crónica provoca un incremento de la concentración de FAs en plasma, debido probablemente a un aumento de la resistencia a insulina en el tejido adiposo [174]. En estudios experimentales [175] y clínicos [176] se ha demostrado que tras el bloqueo de MR se produce una mejora en la respuesta a la insulina por activación de la señalización a través de IRS-1 y una sobreexpresión de receptores de glucosa e insulina, aumentando así la entrada de glucosa en el corazón [177]. De este modo, las acciones hipolipemiantes de la eplerenona podrían ser debidas también a una mejora de la resistencia a insulina periférica [175]. Nosotros observamos una recuperación de los niveles cardíacos de IRS-1 en ratas ZDF tratadas, y una estimulación de la entrada de glucosa en cardiomiocitos expuestos a HF y pretratados con eplerenona. La regulación de la liberación de hormonas lipolíticas desde el tejido adiposo y de la translocación de receptores Glut4 cardíacos por eplerenona, podría ser de gran interés terapéutico.

Consecuentemente, la disminución de la disponibilidad de lípidos plasmáticos podría provocar una reducción de la deposición lipídica (esteatosis) en el corazón. Sin embargo, la eplerenona podría, además, ejercer acciones directas sobre la utilización de FAs en el corazón. En el cardiomiocito, los FAs atraviesan la membrana plasmática por simple difusión, pero principalmente gracias a la proteína transportadora FAT/CD36 [178]. Nosotros observamos un aumento en la expresión y translocación al sarcolema de FAT/CD36 en ZDF así como en cardiomiocitos expuestos a HF, tal como se ha descrito en trabajos previos [179] [21]. Una vez en el interior celular, los FAs son esterificados y transportados hacia diferentes orgánulos por la proteína FABP3, cuya expresión hallamos aumentada en ratas y cardiomiocitos. Sin embargo, la translocación al sarcolema de FAT/CD36 así como la expresión de FABP3 se vieron aminoradas por eplerenona en ambos escenarios. Posteriormente, el principal destino de los FAs es su degradación mediante la  $\beta$ -oxidación. Aproximadamente el 75% del contenido de FAs citosólico se transporta a la mitocondria y se oxida para generar ATP [16]. En comparación con la oxidación de glucosa, la  $\beta$ -oxidación es menos eficiente [180], y además, la entrada de FAs al miocardio puede exceder la capacidad oxidativa y producir acumulación lipídica, lipotoxicidad y aumento de la resistencia a insulina [47]. Nosotros observamos un incremento de la expresión de enzimas de la  $\beta$ -oxidación y de la acumulación de LD citosólicos en ratas ZDF y en cardiomiocitos incubados con HF. Observamos, además, activación de la re-esterificación lipídica y una acumulación de esfingosina en ambas circunstancias, lo que podría relacionarse con la apoptosis y disfunción cardíaca de las ratas. Sin embargo, la eplerenona redujo la cantidad de LD, la expresión de enzimas de re-esterificación y la formación de ceramidas *in vivo* e *in vitro*, contribuyendo así directamente a la reducción de la lipotoxicidad y resistencia a insulina (figura 41). Además, en ratas ZDF, la

expresión de PPAR $\alpha$  se encontró reducida, contribuyendo a un posible incremento del daño por esteatosis [153]. Sin embargo, también los niveles de PPAR $\alpha$  estaban corregidos tras el tratamiento con eplerenona.



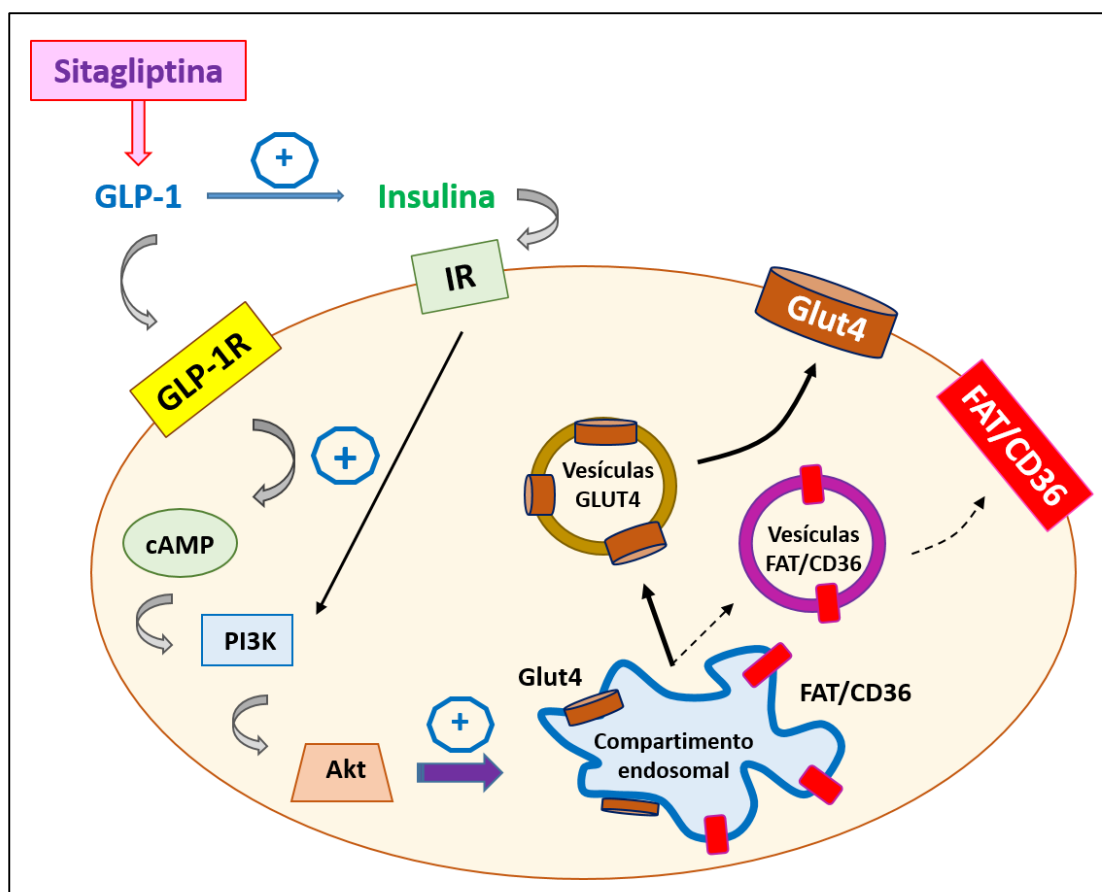
**Figura 41 - Efectos protectores de la eplerenona en el miocardio DM2/obeso.** Los lípidos plasmáticos pueden ser asimilados como FAs y transportados a la mitocondria del cardiomiocito para la consecución de energía. Una sobrecarga de FAs podría causar una excesiva oxidación y producción de ROS con el consiguiente daño mitocondrial y apoptosis. Los FAs también pueden acumularse como TAGs y fosfolípidos (PL) en droplets lipídicos (LD) o desviarse hacia la síntesis de ceramidas. Además, en estas condiciones, la sobreexpresión de RAAS y aldosterona activaría el MR e inducir efectos genómicos y no genómicos sobre factores pro-oxidantes, -apoptóticos y -fibróticos. La eplerenona podría reducir las acciones asociadas a la activación de MR (7) y, además, mitigar la hiperlipemia (1), asimilación y transporte de FFA (2 y 3) y formación de metabolitos tóxicos (4, 5), y activar PPAR $\alpha$  (6).

Finalmente, el aumento de TAG, DAG y ceramidas podría estar relacionado con el daño y desacoplamiento mitocondrial, incrementando la producción de ROS y la entrada de Ca<sup>++</sup> a la mitocondria [74]. Estudios recientes sugieren que la disfunción mitocondrial juega un papel importante en la patogénesis de la MCD [158]. En nuestro modelo, las ratas ZDF mostraron una excesiva producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> principalmente a nivel mitocondrial. Sin embargo, el tratamiento con eplerenona descendió los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y recuperó la generación de ATP en ZDF y cardiomiocitos expuestos a HF. Este efecto podría deberse a la reducción de la lipotoxicidad y resistencia a insulina, aunque trabajos previos también han demostrado propiedades protectoras de la eplerenona en cardiomiocitos hiperosmóticos [181], donde factores pro-inflamatorios y -oxidantes estarían además implicados [182]. Por otro lado, los niveles elevados de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se correlacionan con la expresión reducida del complejo PPAR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$ , estrechamente ligado a factores transcripcionales como Tfam y NRF1 [156]. PGC-1 $\alpha$  se ha visto incrementado en modelos animales de resistencia a insulina, sin embargo, esto podría ser un fenómeno temporal, ya que se ha observado lo



contrario en estadios largos de DM2 [183], como ocurre en nuestro modelo. Consecuentemente, la eplerenona no alteró los niveles de estos reguladores mitocondriales ni en ZDF ni en cardiomiocito estimulado. En conjunto, en DM2/obesidad, la eplerenona podría reducir la lipotoxicidad a través del control directo en el cardiomiocito de la entrada y acumulación de FAs, y desvío a metabolitos secundarios. La eplerenona además podría contribuir a reducir los niveles circulantes de FAs mediante mecanismos aún desconocidos.

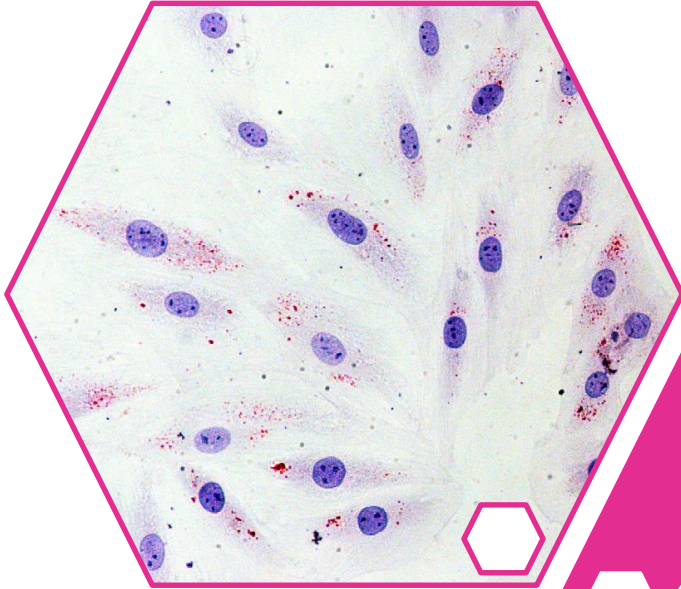
De forma alternativa al bloqueo de MR y continuando con el control de la lipotoxicidad en MCD, existen terapias que además influyen sobre el componente glucídico. La sitagliptina, un fármaco antidiabético inhibidor de la enzima DPP-4, estabiliza los niveles de GLP-1 y aumenta la síntesis y liberación de insulina. Esto deriva en un mayor control de la glicemia y mejor asimilación de glucosa por los tejidos periféricos. Sin embargo, no se conoce si la sitagliptina pudiera regular directamente la entrada de glucosa al corazón y si este efecto pudiera repercutir en el control de la lipotoxicidad. En nuestro modelo de DM2 crónica, las ratas GK presentaron hiperglicemia, resistencia a insulina e hiperlipemia y el tratamiento con sitagliptina redujo el exceso de glucosa y la resistencia a insulina y aumentó los niveles de GLP-1 circulante, tal como se ha descrito previamente [30]. Los niveles plasmáticos de colesterol, TAG y FAs no fueron sin embargo reducidos. En modelos previos de ratas GK con DM2 temprana (16 semanas), la sitagliptina fue capaz de aminorar los niveles de colesterol y TAGs [30]. Es posible que la rata GK con la edad y evolución de DM2 acumule mayor cantidad de grasa como consecuencia de alteraciones en genes relacionados con la adipogénesis y lipogénesis [184]. No obstante, el corazón sano adulto utiliza como fuente energética principal a los FAs, pero tras sufrir un daño, este equilibrio se desplaza hacia la utilización de glucosa. Sin embargo, en DM2, debido a la resistencia a insulina, los FAs son la única fuente energética disponible, y así, la translocación de receptores para glucosa y FAs al sarcolema puede alterarse [185, 186]. En condiciones basales, más del 90% del transportador Glut4 es almacenado intracelularmente en vesículas endosomales, mientras que FAT/CD36 permanece dividido entre específicos *rafts* lipídicos y endosomas. Estímulos como la insulina, la contracción muscular o activación de AMPK [187], provocan que alrededor del 50% del Glut4 intracelular se transloque al sarcolema al mismo tiempo que también se estimula la translocación de FAT/CD36 [162]. Por el contrario, Glut1 presenta una expresión constitutiva en el sarcolema. Nuestros datos en corazones GK muestran una disminución de la translocación de Glut4 al sarcolema en favor de FAT/CD36, y una reducción de la asimilación de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG observada por micro-PET. En concordancia, GK también mostró incremento de expresión de FABP3, Cpt-1b, ACADm y ACADl, y disfunción diastólica. En relación a esto, varios autores han sugerido que un mecanismo potencialmente cardioprotector podría basarse en la reversión favorable de la asimilación y utilización de glucosa en corazones DM2 [188].



**Figura 42 – Efecto de la sitagliptina sobre los transportadores de glucosa y FAs.** GLP-1 ejerce sus acciones a través de GLP-1R y, de forma directa, podría aumentar el tráfico de vesículas Glut4 con el consiguiente aumento de su translocación en detrimento de FAT/CD36.

En nuestro modelo, el tratamiento con sitagliptina aumentó la asimilación de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG e indujo la translocación de Glut4 al sarcolema en detrimento de FAT/CD36. La sitagliptina además redujo la expresión cardíaca de transportadores de FAs y enzimas de la  $\beta$ -oxidación, sin afectar a los niveles de proteínas de síntesis de ceramidas, y así, posiblemente, mitigando la lipotoxicidad y disfunción cardíaca asociada. La inhibición de la DPP-4 ha demostrado tener un papel cardioprotector de forma tanto dependiente como independiente de insulina a través de la estabilización de GLP-1 seguido de la activación de sus receptores GLP-1R pancreáticos y cardíacos, respectivamente [30, 189, 190]. Nosotros sugerimos además que GLP-1 podría aumentar de forma directa la entrada de glucosa en el cardiomiocito mediante la translocación de Glut4 al sarcolema en detrimento de FAT/CD36, resultando en un aumento de la eficiencia energética y en una reducción de la lipotoxicidad asociada (figura 42).





 *CONCLUSIONES*

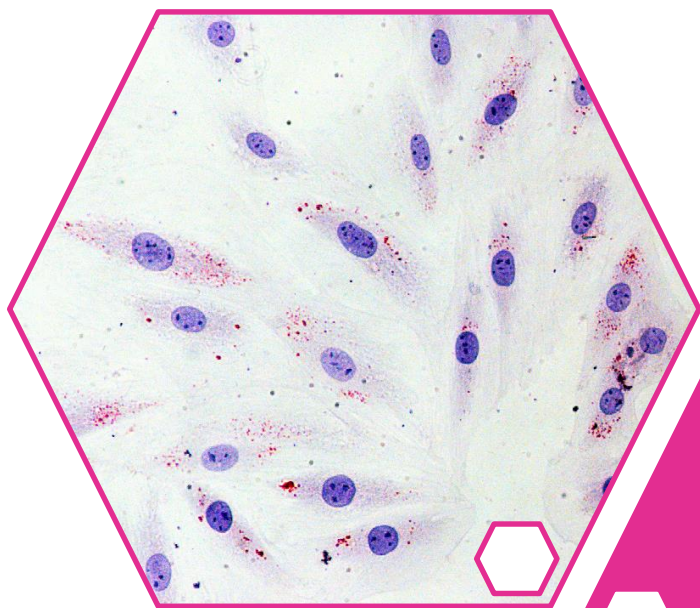


## Conclusiones

1. La acumulación lipídica intramiocárdica en DM2 y obesidad podría jugar un papel importante en la patogénesis de la miocardiopatía diabética asociada.
2. La eplerenona podría reducir la hiperlipemia y la resistencia a insulina, la esteatosis cardiaca así como la acumulación de especies reactivas de oxígeno y ceramidas en el corazón DM2/obeso.
3. Además de su efecto hipoglucemiante, la sitagliptina, podría mejorar la función diastólica en el miocardio DM2 aumentando la presencia de Glut4 en la membrana en detrimento de FAT/CD36.

Nuestros datos sugieren la importancia de incidir en el control de la lipotoxicidad cardiaca del paciente diabético para prevenir o paliar los efectos deletéreos asociados a la miocardiopatía diabética.





## *BIBLIOGRAFÍA*





1. Cerqueira, M.D., et al., *Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association*. J Nucl Cardiol, 2002. **9**(2): p. 240-5.
2. Gonzalez, E.L., et al., *Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996-2005*. J Epidemiol Community Health, 2009. **63**(4): p. 332-6.
3. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
4. Cooke, D.W. and L. Plotnick, *Type 1 diabetes mellitus in pediatrics*. Pediatr Rev, 2008. **29**(11): p. 374-84; quiz 385.
5. Adler, A.I., et al., *Hyperglycemia and hyperinsulinemia at diagnosis of diabetes and their association with subsequent cardiovascular disease in the United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS 47)*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 1): p. S353-9.
6. *U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease*. U.K. Prospective Diabetes Study Group. Diabetes, 1995. **44**(11): p. 1249-58.
7. Orozco, L.J., et al., *Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(3): p. CD003054.
8. Abdullah, A., et al., *The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **89**(3): p. 309-19.
9. Dei Cas, A., et al., *Diabetes and chronic heart failure: from diabetic cardiomyopathy to therapeutic approach*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2013. **13**(1): p. 38-50.
10. Grundy, S.M., *Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(7): p. 635-43.
11. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction*. N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 229-34.
12. Rubler, S., et al., *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis*. Am J Cardiol, 1972. **30**(6): p. 595-602.
13. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy revisited*. Circulation, 2007. **115**(25): p. 3213-23.
14. Bell, D.S., *Diabetic cardiomyopathy*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2949-51.
15. Hayat, S.A., et al., *Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(6): p. 539-57.
16. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy, causes and effects*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(1): p. 31-9.
17. Galderisi, M., *Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Doppler echocardiography*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(8): p. 1548-51.
18. Voulgari, C., et al., *Increased left ventricular arrhythmogenicity in metabolic syndrome and relationship with myocardial performance, risk factors for atherosclerosis, and low-grade inflammation*. Metabolism, 2010. **59**(2): p. 159-65.
19. Ozasa, N., et al., *Relation among left ventricular mass, insulin resistance, and hemodynamic parameters in type 2 diabetes*. Hypertens Res, 2008. **31**(3): p. 425-32.
20. D'Souza, A., et al., *Chronic effects of mild hyperglycaemia on left ventricle transcriptional profile and structural remodelling in the spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat*. Heart Fail Rev, 2014. **19**(1): p. 65-74.
21. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
22. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
23. Crow, M.T., et al., *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis*. Circ Res, 2004. **95**(10): p. 957-70.

24. Cai, L. and Y.J. Kang, *Cell death and diabetic cardiomyopathy*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(3): p. 219-28.
25. Haunstetter, A. and S. Izumo, *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease*. Circ Res, 1998. **82**(11): p. 1111-29.
26. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 663-9.
27. Kaneko, K., et al., *Expression of interleukin-6 in the ventricles and coronary arteries of patients with myocardial infarction*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997. **97**(1): p. 3-12.
28. Ares-Carrasco, S., et al., *Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(6): p. H2109-19.
29. Ares-Carrasco, S., et al., *Proteome changes in the myocardium of experimental chronic diabetes and hypertension: role of PPARalpha in the associated hypertrophy*. J Proteomics, 2012. **75**(6): p. 1816-29.
30. Picatoste, B., et al., *Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78330.
31. Suzuki, Y., et al., *Inflammation and angiotensin II*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 881-900.
32. Xie, N., et al., *alpha-Linolenic acid intake attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in diabetic but not normal rats*. Arch Med Res, 2011. **42**(3): p. 171-81.
33. Yu, X.Y., et al., *Hyperglycemic myocardial damage is mediated by proinflammatory cytokine: macrophage migration inhibitory factor*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16239.
34. Yoshida, T., et al., *Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(2): p. 278-88.
35. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
36. van Empel, V.P. and L.J. De Windt, *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 487-99.
37. Akazawa, H. and I. Komuro, *Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2003. **92**(10): p. 1079-88.
38. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 470-9.
39. Dorn, G.W., 2nd and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 527-37.
40. Wilkins, B.J. and J.D. Molkentin, *Calcium-calmodulin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1178-91.
41. Jacoby, J.J., et al., *Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12929-34.
42. Nishikimi, T., N. Maeda, and H. Matsuoka, *The role of natriuretic peptides in cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(2): p. 318-28.
43. Aroor, A.R., C.H. Mandavia, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms*. Heart Fail Clin, 2012. **8**(4): p. 609-17.
44. Flanders, K.C., *Smad3 as a mediator of the fibrotic response*. Int J Exp Pathol, 2004. **85**(2): p. 47-64.
45. van Heerebeek, L., et al., *Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension*. Circulation, 2008. **117**(1): p. 43-51.

46. Bosma, M., et al., *The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria*. Histochem Cell Biol, 2012. **137**(2): p. 205-16.
47. Sharma, S., et al., *Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1692-700.
48. Szczepaniak, L.S., et al., *Measurement of intracellular triglyceride stores by <sup>1</sup>H spectroscopy: validation in vivo*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. E977-89.
49. Jonnalagadda, V.G., et al., *The prelude on novel receptor and ligand targets involved in the treatment of diabetes mellitus*. Adv Pharm Bull, 2014. **4**(3): p. 209-17.
50. Flier, J.S., et al., *Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes*. Science, 1987. **235**(4795): p. 1492-5.
51. Dey, D., et al., *Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **246**(1-2): p. 60-4.
52. Das Evcimen, N. and G.L. King, *The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes*. Pharmacol Res, 2007. **55**(6): p. 498-510.
53. Min, W., et al., *The signal transduction pathway of PKC/NF-kappa B/c-fos may be involved in the influence of high glucose on the cardiomyocytes of neonatal rats*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**: p. 8.
54. Poornima, I.G., P. Parikh, and R.P. Shannon, *Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis*. Circ Res, 2006. **98**(5): p. 596-605.
55. Han, D., et al., *Induction of receptor for advanced glycation end products by insufficient leptin action triggers pancreatic beta-cell failure in type 2 diabetes*. Genes Cells, 2013. **18**(4): p. 302-14.
56. Wang, J., et al., *Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy*. Rev Diabet Stud, 2006. **3**(3): p. 108-17.
57. Yanagida, K., et al., *Hexosamine pathway but not interstitial changes mediates glucotoxicity in pancreatic beta-cells as assessed by cytosolic Ca<sup>2+</sup> response to glucose*. Aging (Albany NY), 2014. **6**(3): p. 207-14.
58. Rho, M.C., et al., *Sensitization of vascular smooth muscle cell to TNF-alpha-mediated death in the presence of palmitate*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **220**(3): p. 311-9.
59. Su, X. and N.A. Abumrad, *Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(2): p. 72-7.
60. Luiken, J.J., L.P. Turcotte, and A. Bonen, *Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles*. J Lipid Res, 1999. **40**(6): p. 1007-16.
61. Oquendo, P., et al., *CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes*. Cell, 1989. **58**(1): p. 95-101.
62. Ho, M., et al., *Ectophosphorylation of CD36 regulates cytoadherence of Plasmodium falciparum to microvascular endothelium under flow conditions*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8179-87.
63. Ehehalt, R., et al., *Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts)*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 45.
64. Luiken, J.J., et al., *Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3113-9.
65. Anderson, E.J., et al., *Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(20): p. 1891-8.
66. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
67. Carley, A.N. and D.L. Severson, *Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1734**(2): p. 112-26.
68. Schoonderwoerd, K., et al., *Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischaemia and diabetes*. Biochem J, 1990. **268**(2): p. 487-92.

69. van Herpen, N.A. and V.B. Schrauwen-Hinderling, *Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity*. *Physiol Behav*, 2008. **94**(2): p. 231-41.
70. Hickson-Bick, D.L., L.M. Buja, and J.B. McMillin, *Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(3): p. 511-9.
71. Madrazo, J.A. and D.P. Kelly, *The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. **44**(6): p. 968-75.
72. Martinasso, G., et al., *Involvement of PPARs in Cell Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Specimens and in Normal and Cancer Cell Lines*. *PPAR Res*, 2007. **2007**: p. 93416.
73. Finck, B.N., et al., *The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(1): p. 121-30.
74. van de Weijer, T., V.B. Schrauwen-Hinderling, and P. Schrauwen, *Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy*. *Cardiovasc Res*, 2011. **92**(1): p. 10-8.
75. Wagner, K.D. and N. Wagner, *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions*. *Pharmacol Ther*, 2010. **125**(3): p. 423-35.
76. Liang, Y.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta agonists attenuated the C-reactive protein-induced pro-inflammation in cardiomyocytes and H9c2 cardiomyoblasts*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **643**(1): p. 84-92.
77. Barroso, E., et al., *The PPARbeta/delta activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1alpha-Lipin 1-PPARalpha pathway leading to increased fatty acid oxidation*. *Endocrinology*, 2011. **152**(5): p. 1848-59.
78. Glatz, J.F., et al., *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006. **20**(6): p. 471-6.
79. Glatz, J.F., J.J. Luiken, and A. Bonen, *Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(1): p. 367-417.
80. Stanley, W.C., G.D. Lopaschuk, and J.G. McCormack, *Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart*. *Cardiovasc Res*, 1997. **34**(1): p. 25-33.
81. Mandavia, C.H., et al., *Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy*. *Metabolism*, 2012. **61**(9): p. 1205-10.
82. van den Brom, C.E., et al., *Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. **8**: p. 39.
83. Wallhaus, T.R., et al., *Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure*. *Circulation*, 2001. **103**(20): p. 2441-6.
84. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. *Heart*, 2007. **93**(8): p. 903-7.
85. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, *Energy metabolism in heart failure*. *J Physiol*, 2004. **555**(Pt 1): p. 1-13.
86. Marchi, S., et al., *Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging*. *J Signal Transduct*, 2012. **2012**: p. 329635.
87. Di Filippo, C., et al., *Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006. **24**(2): p. 77-87.
88. Croteau, D.L., R.H. Stierum, and V.A. Bohr, *Mitochondrial DNA repair pathways*. *Mutat Res*, 1999. **434**(3): p. 137-48.
89. Larsson, N.G., et al., *Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice*. *Nat Genet*, 1998. **18**(3): p. 231-6.
90. He, L., et al., *Carnitine palmitoyltransferase-1b deficiency aggravates pressure overload-induced cardiac hypertrophy caused by lipotoxicity*. *Circulation*, 2012. **126**(14): p. 1705-16.
91. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. *Circ Res*, 2004. **95**(6): p. 568-78.



92. Lehman, J.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 847-56.
93. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
94. Barrios, V., C. Escobar, and R. Echarri, *Fixed combinations in the management of hypertension: perspectives on lercanidipine-enalapril*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(4): p. 847-53.
95. Fang, Z.Y., J.B. Prins, and T.H. Marwick, *Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 543-67.
96. Raizada, V., et al., *Intracardiac and intrarenal renin-angiotensin systems: mechanisms of cardiovascular and renal effects*. J Investig Med, 2007. **55**(7): p. 341-59.
97. Manabe, I., T. Shindo, and R. Nagai, *Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2002. **91**(12): p. 1103-13.
98. Marcy, T.R. and T.L. Ripley, *Aldosterone antagonists in the treatment of heart failure*. Am J Health Syst Pharm, 2006. **63**(1): p. 49-58.
99. Catena, C., et al., *Aldosterone and aldosterone antagonists in cardiac disease: what is known, what is new*. Am J Cardiovasc Dis, 2012. **2**(1): p. 50-7.
100. Nguyen Dinh Cat, A. and F. Jaisser, *Extrarenal effects of aldosterone*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(2): p. 147-56.
101. Lee, Y.S., et al., *Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes*. J Korean Med Sci, 2004. **19**(6): p. 805-11.
102. Schrier, R.W. and W.T. Abraham, *Hormones and hemodynamics in heart failure*. N Engl J Med, 1999. **341**(8): p. 577-85.
103. Dzau, V.J., et al., *The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data*. Am J Cardiol, 2001. **88**(9A): p. 1L-20L.
104. De Silva, D.S., et al., *Fenofibrate inhibits aldosterone-induced apoptosis in adult rat ventricular myocytes via stress-activated kinase-dependent mechanisms*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(6): p. H1983-93.
105. Engeli, S., *Role of the renin-angiotensin- aldosterone system in the metabolic syndrome*. Contrib Nephrol, 2006. **151**: p. 122-34.
106. Pitt, B., C.T. Stier, Jr., and S. Rajagopalan, *Mineralocorticoid receptor blockade: new insights into the mechanism of action in patients with cardiovascular disease*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2003. **4**(3): p. 164-8.
107. Voulgari, C., D. Papadogiannis, and N. Tentolouris, *Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies*. Vasc Health Risk Manag, 2010. **6**: p. 883-903.
108. Garcia, M.J., J.D. Thomas, and A.L. Klein, *New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 865-75.
109. Rijzewijk, L.J., et al., *Altered myocardial substrate metabolism and decreased diastolic function in nonischemic human diabetic cardiomyopathy: studies with cardiac positron emission tomography and magnetic resonance imaging*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(16): p. 1524-32.
110. Nakae, I., et al., *Clinical features of myocardial triglyceride in different types of cardiomyopathy assessed by proton magnetic resonance spectroscopy: comparison with myocardial creatine*. J Card Fail, 2010. **16**(10): p. 812-22.
111. Kudo, T., et al., *Noninvasive measurement of myocardial activity concentrations and perfusion defect sizes in rats with a new small-animal positron emission tomograph*. Circulation, 2002. **106**(1): p. 118-23.
112. van der Meer, R.W., et al., *Pioglitazone improves cardiac function and alters myocardial substrate metabolism without affecting cardiac triglyceride accumulation and high-energy phosphate metabolism in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2009. **119**(15): p. 2069-77.
113. Ter-Pogossian, M.M., M.E. Raichle, and B.E. Sobel, *Positron-emission tomography*. Sci Am, 1980. **243**(4): p. 170-81.

114. Baliga, V. and R. Sapsford, *Review article: Diabetes mellitus and heart failure--an overview of epidemiology and management*. Diab Vasc Dis Res, 2009. **6**(3): p. 164-71.
115. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 854-65.
116. Meier, M. and M. Hummel, *Cardiovascular disease and intensive glucose control in type 2 diabetes mellitus: moving practice toward evidence-based strategies*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**: p. 859-71.
117. Group, A.S., et al., *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial: design and methods*. Am J Cardiol, 2007. **99**(12A): p. 21i-33i.
118. Patel, A., J. Chalmers, and N. Poulter, *ADVANCE: action in diabetes and vascular disease*. J Hum Hypertens, 2005. **19 Suppl 1**: p. S27-32.
119. Agrawal, L., et al., *Observation on renal outcomes in the Veterans Affairs Diabetes Trial*. Diabetes Care, 2011. **34**(9): p. 2090-4.
120. Skyler, J.S., et al., *Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials: a position statement of the American Diabetes Association and a Scientific Statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(3): p. 298-304.
121. Kang, Y.M., et al., *Novel effect of mineralocorticoid receptor antagonism to reduce proinflammatory cytokines and hypothalamic activation in rats with ischemia-induced heart failure*. Circ Res, 2006. **99**(7): p. 758-66.
122. Weber, K.T., *Aldosterone in congestive heart failure*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1689-97.
123. Farquharson, C.A. and A.D. Struthers, *Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 594-7.
124. Pitt, B., et al., *Evaluation of eplerenone in the subgroup of EPHEsus patients with baseline left ventricular ejection fraction  $\leq 30\%$* . Eur J Heart Fail, 2006. **8**(3): p. 295-301.
125. Meier, J.J. and M.A. Nauck, *Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology*. Diabetes Metab Res Rev, 2005. **21**(2): p. 91-117.
126. Nauck, M.A., *Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications*. Am J Med, 2011. **124**(1 Suppl): p. S3-18.
127. Deacon, C.F., R.D. Carr, and J.J. Holst, *DPP-4 inhibitor therapy: new directions in the treatment of type 2 diabetes*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1780-94.
128. Ahren, B., *Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin--diabetes control and potential adverse events*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(4): p. 487-98.
129. Finegood, D.T., et al., *Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1021-9.
130. Boussageon, R., et al., *Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ, 2011. **343**: p. d4169.
131. Chatham, J.C. and A.M. Seymour, *Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(1): p. 104-12.
132. Anderson, R.J. and D.W. Barry, *Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2004. **18**(1): p. 1-20.
133. Portha, B., et al., *The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes*. Methods Mol Biol, 2012. **933**: p. 125-59.
134. Phelps, M.E., et al., *Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method*. Ann Neurol, 1979. **6**(5): p. 371-88.

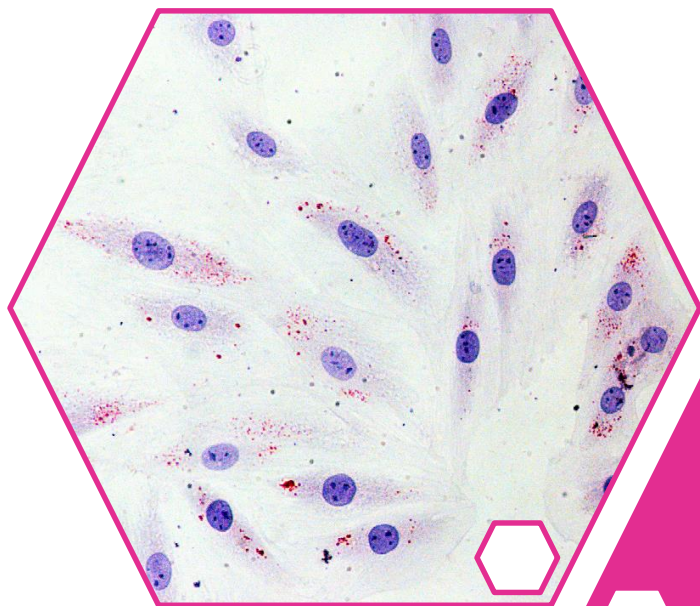
135. Kudo, T., *Metabolic imaging using PET*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34 Suppl 1**: p. S49-61.
136. Thie, J.A., *Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage*. J Nucl Med, 2004. **45**(9): p. 1431-4.
137. Rani, S.D., et al., *Kinetic analysis of FDG in rat liver: effect of dietary intervention on arterial and portal vein input*. Nucl Med Biol, 2013. **40**(4): p. 537-46.
138. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
139. Mehlem, A., et al., *Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease*. Nat Protoc, 2013. **8**(6): p. 1149-54.
140. Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler, *Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*. J Cell Biol, 1985. **100**(3): p. 965-73.
141. Bursch, W., L. Kleine, and M. Tenniswood, *The biochemistry of cell death by apoptosis*. Biochem Cell Biol, 1990. **68**(9): p. 1071-4.
142. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, *Properties of a clonal muscle cell line from rat heart*. Exp Cell Res, 1976. **98**(2): p. 367-81.
143. Ramirez, E., et al., *Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 172.
144. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1664-72.
145. Markowitz, M., F. Messineo, and N.L. Coplan, *Aldosterone receptor antagonists in cardiovascular disease: a review of the recent literature and insight into potential future indications*. Clin Cardiol, 2012. **35**(10): p. 605-9.
146. Baker, W.L. and W.B. White, *Safety of mineralocorticoid receptor antagonists in patients receiving hemodialysis*. Ann Pharmacother, 2012. **46**(6): p. 889-94.
147. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
148. Anai, M., et al., *Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats*. Diabetes, 1998. **47**(1): p. 13-23.
149. Miric, G., et al., *Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(5): p. 687-94.
150. Ueno, M., et al., *Cardiac overexpression of hormone-sensitive lipase inhibits myocardial steatosis and fibrosis in streptozotocin diabetic mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(6): p. E1109-18.
151. Luiken, J.J., et al., *Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1627-34.
152. Zhang, L., et al., *Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(1): p. 1-22.
153. Zhou, Y.T., et al., *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1784-9.
154. Summers, S.A., *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(1): p. 42-72.
155. Van Nieuwenhoven, F.A., et al., *Stable transfection of fatty acid translocase (CD36) in a rat heart muscle cell line (H9c2)*. J Lipid Res, 1998. **39**(10): p. 2039-47.
156. Philp, A., et al., *Pyruvate suppresses PGC1alpha expression and substrate utilization despite increased respiratory chain content in C2C12 myotubes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C240-50.
157. Dekker, M.J., et al., *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(5): p. E685-94.
158. Duncan, J.G., *Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1351-9.



159. Zhao, T., et al., *Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(3): p. 1106-13.
160. Cacho, J., et al., *Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(5): p. E1269-76.
161. Schwenk, R.W., et al., *Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 249-58.
162. Steinbusch, L.K., et al., *Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(15): p. 2525-38.
163. Linz, D., et al., *Cardiac remodeling and myocardial dysfunction in obese spontaneously hypertensive rats*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 187.
164. Stenbit, A.E., et al., *Preservation of glucose metabolism in hypertrophic GLUT4-null hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(1): p. H313-8.
165. Rubin, J., et al., *Chronic hyperglycemia and subclinical myocardial injury*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(5): p. 484-9.
166. Castagno, D., et al., *Intensive glycemic control has no impact on the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: evidence from a 37,229 patient meta-analysis*. Am Heart J, 2011. **162**(5): p. 938-948 e2.
167. Iraqi, W., et al., *Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study*. Circulation, 2009. **119**(18): p. 2471-9.
168. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
169. Garcarena, C.D., et al., *Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(4): p. 1325-31.
170. Beaumont, J., et al., *Overexpression of human truncated peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces apoptosis in HL-1 cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 458-63.
171. Schwenk, R.W., et al., *Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes*. Diabetologia, 2010. **53**(10): p. 2209-19.
172. Guo, C., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2253-61.
173. Sato, A. and S. Fukuda, *Clinical effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker, in Japanese patients with essential hypertension*. J Hum Hypertens, 2010. **24**(6): p. 387-94.
174. Normand-Lauziere, F., et al., *Increased postprandial nonesterified fatty acid appearance and oxidation in type 2 diabetes is not fully established in offspring of diabetic subjects*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10956.
175. Calle, C., et al., *Transcriptional inhibition of the human insulin receptor gene by aldosterone*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **84**(5): p. 543-53.
176. Tirosh, A., R. Garg, and G.K. Adler, *Mineralocorticoid receptor antagonists and the metabolic syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2010. **12**(4): p. 252-7.
177. Selvaraj, J., et al., *Impact of excess aldosterone on glucose homeostasis in adult male rat*. Clin Chim Acta, 2009. **407**(1-2): p. 51-7.
178. Nickerson, J.G., et al., *Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle*. J Biol Chem, 2009. **284**(24): p. 16522-30.

179. Carley, A.N., et al., *Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice*. Arch Physiol Biochem, 2007. **113**(2): p. 65-75.
180. Balaban, R.S., *Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1259-71.
181. Sanchez-Mas, J., et al., *Differential actions of eplerenone and spironolactone on the protective effect of testosterone against cardiomyocyte apoptosis in vitro*. Rev Esp Cardiol, 2010. **63**(7): p. 779-87.
182. Mano, A., et al., *Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 317-23.
183. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
184. Xue, B., et al., *Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17386.
185. Coort, S.L., et al., *Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1655-63.
186. Abel, E.D., K.M. O'Shea, and R. Ramasamy, *Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2068-76.
187. Luiken, J.J., et al., *Dipyridamole alters cardiac substrate preference by inducing translocation of FAT/CD36, but not that of GLUT4*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(3): p. 639-45.
188. Liu, Q., et al., *Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure*. Cardiovasc Diabetol, 2010. **9**: p. 76.
189. Green, J.B., et al., *Rationale, design, and organization of a randomized, controlled Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS) in patients with type 2 diabetes and established cardiovascular disease*. Am Heart J, 2013. **166**(6): p. 983-989 e7.
190. Noyan-Ashraf, M.H., et al., *GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice*. Diabetes, 2009. **58**(4): p. 975-83.





➤ **Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:**

- ✚ **Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes.**

E. Ramírez, M. Klett-Mingo, S. Ares Carrasco, B. Picatoste, A. Ferrarini, F. J. Rupérez, A. Caro-Vadillo, C. Barbas, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2013.

- ✚ **Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential role of GLP-1 isoforms.**

B. Picatoste, E. Ramírez, A. Caro-Vadillo, C. Iborra, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *Plos One*, 2013

- ✚ **Targeting metabolic disturbance in the diabetic heart.**

J. Fuentes-Antrás, B. Picatoste, E. Ramírez, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2015.

- ✚ **Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy.**

O. Lorenzo, E. Ramírez, B. Picatoste, J. Egido, J. Tuñón. *Mediators of Inflamm.*, 2013.

- ✚ **Potential role of nuclear factor  $\kappa$ B in diabetic cardiomyopathy.**

O. Lorenzo, B. Picatoste, S. Ares-Carrasco, E. Ramírez, J. Egido, J. Tuñón. *Mediators of Inflamm.*, 2011.

➤ **Artículos en fase de redacción:**

- ✚ **Sitagliptin improves glucose utilization in detriment of fatty-acid uptake in experimental type-II diabetes.**

E. Ramírez, M. Klett-Mingo, B. Picatoste, A. Caro-Vadillo, J. Egido, M.A. Morcillo, J. Tuñón, O. Lorenzo.

➤ **Presentaciones en reuniones científicas:**

➤ **Comunicaciones orales**

- ✚ **Role of microRNA-133a in the regulation of angiotensinogen in experimental diabetic cardiomyopathy.**

E. Ramírez, R. Bragado, S. Ares-Carrasco, B. Picatoste, A. Caro-Vadillo, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *European Society of Cardiology (ESC) Congress*. Agosto 2012. Munich.

- ✚ **Potential role of microRNA-133a on the regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in experimental diabetic cardiomyopathy.**

E. Ramírez, R. Bragado, S. Ares-Carrasco, B. Picatoste, A. Caro-Vadillo, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *20<sup>th</sup> European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR) Annual Meeting*. Mayo 2011. Ginebra.

- ✚ **Papel del microRNA-133a en la regulación de angiotensinógeno en la miocardiopatía diabética.**

E. Ramírez, R. Bragado, S. Ares-Carrasco, B. Picatoste, A. Caro-Vadillo, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *Congreso de la Sociedad Española de Cardiología (SEC)*. Octubre 2011. Maspalomas.

➤ **Comunicaciones en póster**

- ✚ **La sitagliptina reduce la asimilación de ácidos grasos en favor de glucosa en el corazón diabética experimental.**

E. Ramírez, M. Klett-Mingo, B. Picatoste, A. Caro-Vadillo, J. Egido, M.A. Morcillo, J. Tuñón, O. Lorenzo. *19ª Reunión Nacional Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA)*. Marzo de 2014. Madrid.

- ✚ **La eplerenona atenúa la esteatosis y apoptosis cardiaca en la rata diabética tipo-II con obesidad asociada**

E. Ramírez, M. Klett-Mingo, S. Ares Carrasco, B. Picatoste, A. Ferrarini, F. J. Rupérez, A. Caro-Vadillo, C. Barbas, J. Egido, J. Tuñón, O. Lorenzo. *18ª Reunión Nacional Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA)*. Marzo de 2013. Valencia.